



Ancestral haplotype 8.1 in cystic fibrosis

Julie Beucher

► To cite this version:

Julie Beucher. Ancestral haplotype 8.1 in cystic fibrosis. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66142 . tel-00827653

HAL Id: tel-00827653

<https://theses.hal.science/tel-00827653>

Submitted on 29 May 2013

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Physiologie & Physiopathologie

Présentée par

Mme BEUCHER Julie
Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Haplotype ancestral AH8.1 dans la mucoviscidose

soutenue le 18 Juin 2012

devant le jury composé de :

M. Michel CHIGNARD Président du jury

Mme. Pascale FANEN et M. Jacques BROUARD Rapporteurs

M. Jean-Michel SALLENAVE et M. Pierre-Yves BOELLE Examineurs

Mme. Harriet CORVOL Directeur de thèse

« L'optimisme c'est la RAGE de soutenir que tout est bien quand on est mal »
Cabaret Voltaire

« Patience et longueur de temps
Font plus que force ni que rage. » De La Fontaine

« Oh RAGE, oh désespoir », dernier acte, dernière scène...

Remerciements

Mes premiers remerciements iront à Harriet Corvol, ma directrice de thèse, pour m'avoir accompagnée dans ce travail. Depuis 4 ans, malgré ton « hyperactivité », tu as su avoir une oreille attentive chaque fois que nécessaire. J'espère poursuivre cette aventure tant personnelle que professionnelle.

Je remercie également Mr Michel Chignard de me faire l'honneur d'exercer les fonctions de président du jury.

Je remercie le Docteur Pascale Fanen et le Professeur Jacques Brouard d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assurés, Madame, Monsieur, de mon respect et de ma reconnaissance pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse.

Je remercie également Pierre-Yves Boelle, qui a largement contribué à ces travaux et pour sa participation en tant que membre du jury.

Je remercie le Dr Jean Michel Sallenave pour sa participation en tant que membre du jury.

Je tiens particulièrement à remercier le Professeur Annick Clément pour m'avoir accueilli à la fois au sein de son unité de recherche, mais également dans le service de Trousseau. J'ai apprécié ces années passées à vos côtés.

Je remercie également le CHU de Rennes pour m'avoir financé et soutenu pendant ces années de recherche. Je remercie également mes chefs de Rennes pour m'avoir fait confiance et encouragé. C'est avec grand plaisir que je reviens travailler à vos côtés.

Je remercie la société de pneumologie pédiatrique et d'allergologie pour avoir participé au financement de mon projet scientifique.

Je remercie les infirmières du CRCM, Cécile et Maryse, pour avoir toujours été disponibles, attentives à mes attentes. On retourne chez Gudule quand vous voulez !

Je remercie Ralph Epaud sans qui toute cette aventure ne serait peut-être jamais arrivée.

Merci aux ARC pour gérer toutes ces données qui m'ont été indispensables. Et plus particulièrement Alexandra pour avoir fait le « taxi d'ADN »...

Je remercie Pierre-François pour ta disponibilité, je n'oublierai pas la multiplicité des tests...

Je remercie tous les membres de l'équipe pour ces années passées ensemble. Merci à Olivier et Loïc d'avoir toujours répondu à mes questions, même quand je craquais sur ces cellules qui ne poussent jamais quand il faut. J'ai eu la Rage !!! Merci Mr Gluglu et Mme Serpine pour les pauses café et cette attention toute particulière de m'informer des derniers pottins, il me manque quelques références closer depuis ton départ... Merci à Manoune pour ces pauses clope auxquelles je ne participais jamais ! Merci Elise pour ta bonne humeur surtout le vendredi ! Merci Solenne pour nos virées aquatiques. Et merci à toutes pour nos petites dégustations de Chardonnay... A quand le BimBamBoum ?! Merci Céline pour m'avoir initiée à la science et pour ces moments partagés à Lacaze ! Merci à Ambre et Mélanie pour ces quelques instants blind test musicaux !

Merci à mes parents de m'avoir accueilli pendant ces 18 mois. C'était bon ce petit bain d'adolescence ! La pudeur me limitera à dire « merci pour tout ».

Merci à mon frère et Axelle, bon j'ai fait une deuxième thèse pour vous convier à mon pot. Encore raté, mais je vais attendre un peu pour la troisième!

Merci à ma famille et belle-famille

Merci à Sylvie, Pauline, Monique, Sabine sans qui j'aurai passé quelques nuits sous les ponts !!

Merci à mes amis rennais, briochins (pays du crachin ne l'oublions pas), toulousains, beaunois, parisiens. Une de mes regrets de quitter Paris sera de ne plus vous voir lors d'une escale, d'un cours de DU,... Mais notre porte restera toujours grande ouverte.

Merci Martin. Et promis j'arrête les études... Enfin au moins quelques mois !

Sommaire

INTRODUCTION.....	8
1. Généralités sur la mucoviscidose	9
1.1 Historique	9
1.2. Gène et protéine CFTR.....	9
1.3. Mutations du gène CFTR	12
1.4. Méthodes diagnostiques	14
1.5. Manifestations cliniques.....	15
1.6. Explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) dans la mucoviscidose	17
1.7. Principes de traitement	18
1.7.1. Prise en charge de l'atteinte digestive	18
1.7.2. Prise en charge de l'atteinte pulmonaire	18
2. Caractéristiques de l'atteinte inflammatoire dans la mucoviscidose.....	21
2.1. Inflammation respiratoire précoce.....	22
2.2. Déséquilibre entre protéases et anti protéases	23
2.3. Dérégulation des voies NF-kB et AP-1 dans la mucoviscidose	24
3. Gènes modificateurs	24
3.1. Corrélation phénotype-génotype liée au gène CFTR	25
3.1.1. Corrélation selon les types de mutations de CFTR	25
3.1.2. Influence de facteurs génétiques modificateurs hétéroalléliques de CFTR.....	29
3.2. Influence des gènes modificateurs autres que le gène CFTR.....	30
3.2.1. Polymorphismes et phénotype digestif	30
3.2.2. Polymorphismes et phénotype respiratoire	31
3.2.3. Polymorphismes et autres symptômes	33
4. Haplotype ancestral AH8.1	34
4.1. Heat Shock Protein70-2 (HSP70-2 ou HSPA1B)	35
4.1.1. Gène et protéine	35
4.1.2. Production, régulation	36
4.1.3. Fonctions.....	37
4.1.4. HSP et pathologies pulmonaires	38
4.1.5. Polymorphismes du HSP	39
4.2. Tumor Necrosis Factor α (TNF α).....	40
4.2.1. Gène et protéine	40
4.2.2. Production, régulation	40
4.2.3. Fonctions.....	41

4.2.4. <i>TNF et pathologies pulmonaires</i>	42
4.2.5. <i>Polymorphismes du TNF-α</i>	43
4.3. Lymphotoxine alpha (LTA)	44
4.3.1. <i>Gène et protéine</i>	44
4.3.2. <i>Production, régulation</i>	44
4.3.3. <i>Fonctions</i>	45
4.3.4. <i>LTA et pathologies pulmonaires</i>	45
4.3.5. <i>Polymorphismes du LTA</i>	45
4.4. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)	46
4.4.1. <i>Gène et protéine</i>	46
4.4.2. <i>Production, régulation</i>	46
4.4.3. <i>Fonctions</i>	48
4.4.4. <i>RAGE et pathologies pulmonaires</i>	49
4.4.5. <i>Polymorphismes de AGER</i>	51
4.5. Implications cliniques de l'haplotype AH8.1	52
4.6. Implications de l'haplotype AH8.1 dans la mucoviscidose	55
5. Ligands de RAGE	55
5.1. High mobility group box 1 (HMGB1)	55
5.1.1. <i>Gène et protéine</i>	55
5.1.2. <i>Production, régulation</i>	56
5.1.3. <i>HMGB1 et fonctions</i>	57
5.1.4. <i>HMGB1 et pathologies</i>	57
5.2. Calgranuline (S100)	58
5.2.1. <i>Gène et protéine</i>	58
5.2.2. <i>Production, régulation</i>	59
5.2.3. <i>S100A et pathologies</i>	60
OBJECTIFS DE TRAVAIL	61
MATERIEL ET METHODES	63
1. Populations d'étude	64
2. Méthodes de génotypage	65
3. Dosages plasmatiques	67
3.1. Soluble RAGE	67
3.2. TNF-α	67
3.3. LTA	67
3.4. HMGB1	68
4. Etude fonctionnelle <i>in vitro</i> du polymorphisme AGER -429T/C	68

4.1. Clonage du promoteur de <i>AGER</i>	68
4.2. Préparation des vecteurs et mutagenèse dirigée	69
4.3. Transfection cellulaire	69
4.4. Lecture luciférase	69
5. Etude <i>ex vivo</i> à partir de fibroblastes humains	70
5.1. Culture et entretien des cellules.....	70
5.1.1. <i>Modèle cellulaire</i>	70
5.1.2. <i>Culture de fibroblastes</i>	70
5.1.3. <i>Entretien des cellules</i>	71
5.1.4. <i>Blocage de la transcription</i>	71
5.2. Etude de biologie moléculaire	71
5.2.1. <i>Extraction des ADN et ARN</i>	71
5.2.2. <i>RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction et PCR semi-quantitative</i>	71
6. Analyses statistiques.....	72
RESULTATS	74
Partie 1. Etude de l'haplotype ancestral AH8.1	74
1. Etude européenne préliminaire.....	75
1.1. Article 1. Ancestral haplotype 8.1 and lung disease severity in European cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros, 2012 Jan;11(1):63-7.	75
1.2. Résultats complémentaires	76
1.3. Discussion	77
2. Réplication des résultats de l'haplotype AH8.1 dans une cohorte de patients F508del homozygotes	85
2.1. Population d'étude.....	85
2.2. Résultats	85
2.3. Discussion	86
3. Réplication des résultats de l'haplotype AH8.1 dans une cohorte de patients sévères non F508del homozygotes.....	87
3.1. Population d'étude.....	87
3.2. Résultats	88
3.3. Discussion	88
Partie 2. Etude des variants composant l'haplotype AH8.1	89
4. Etude de polymorphisme <i>AGER</i> -429T/C	90
4.1. Article 2. <i>AGER</i> -429T/C is associated with an increased lung cystic fibrosis disease severity 90	
4.2. Résultats complémentaires sur RAGE	111
4.2.1. <i>Génotypage de AGER</i>	111

4.2.2. Dosage plasmatique de sRAGE et étude génotype/phénotype.....	111
4.2.3. Etude HMGB1	113
4.3. Discussion	113
5. Etude du polymorphisme de <i>HSP</i> 1267A/G.....	116
5.1. Génotypage du polymorphisme.....	116
5.2. Etude fonctionnelle du polymorphisme.....	116
5.2.1. Génotypage de l'haplotype ancestral AH8.1.....	117
5.2.2. Recueil d'ARN et PCR semi quantitative.....	117
5.3. Discussion	118
6. Etude du polymorphisme <i>TNF</i> -308G/A	119
6.1. Génotypage du polymorphisme.....	119
6.2. Dosages plasmatiques.....	119
6.3. Discussion	120
7. Etude du polymorphisme <i>LTA</i> +252A/G.....	121
7.1. Génotypage du polymorphisme.....	121
7.2. Etudes fonctionnelles du polymorphisme	121
7.2.1. Dosages plasmatiques	121
7.2.2. Analyses bioinformatiques.....	121
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	125
BIBLIOGRAPHIE	132
LISTE DES ABREVIATIONS	151

TABLEAUX ET FIGURES

FIGURES

<u>Figure 1 Structure prédictive de la protéine CFTR</u>	10
<u>Figure 2 Schéma d'un épithélium sécrétoire centré sur CFTR, protéine multifonctionnelle</u>	11
<u>Figure 3 Différentes classes de mutations du gène CFTR</u>	12
<u>Figure 4 Cercle vicieux infection/inflammation</u>	23
<u>Figure 5 Meilleure corrélation de la fonction respiratoire chez les jumeaux MZ par rapport aux fratries (Vanscoy et al. 2007)</u>	28
<u>Figure 6 Etude de GWAS: identification de 7 régions associée à la sévérité de la fonction pulmonaire (Wright et al. 2011)</u>	33
<u>Figure 7 Localisation de l'haplotype ancestral AH8.1 au sein du complexe majeur d'histocompatibilité</u>	35
<u>Figure 8 Localisation des gènes HSP sur le chromosome 6p21 (D'après (Kee et al. 2008))</u>	35
<u>Figure 9 Rôle de molécule chaperonne des HSP</u>	37
<u>Figure 10 Représentation schématique du récepteur RAGE (D'après (Vazzana et al. 2009))</u>	47
<u>Figure 11 Voies de signalisation de RAGE (D'après (Vazzana et al. 2009))</u>	49
<u>Figure 12 Récapitulatif des 4 gènes étudiés composant l'haplotype AH8.1</u>	52
<u>Figure 13 Différenciation des lymphocytes Th0 en cellules Th1 et Th2 et régulation</u>	54
<u>Figure 14 Représentation schématique de HMGB1 (d'après (Knapp et al. 2004))</u>	56
<u>Figure 15 Rôles intra- et extracellulaires de la protéine HMGB1 (D'après Lotze et Tracey, 2005)</u>	57
<u>Figure 16 Représentation schématique du motif en main EF. D'après http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/EF-Hand.jpg.</u>	59
<u>Figure 17 Principes de la discrimination allélique par méthode de fluorescence</u>	66
<u>Figure 18 Exemple de résultat de génotypage pour le TNF</u>	66
<u>Figure 19 Effets de l'haplotype ancestral AH8.1 sur la fonction respiratoire mesurée par le VEMS chez des patients européens ayant la mucoviscidose</u>	76

<u>Figure 20 Effets de l'haplotype ancestral 8.1AH sur la fonction respiratoire mesurée par le VEMS en fonction des mutations de CFTR (D/D : F508del homozygotes, Autres : autres mutations de CFTR toutes sévérités confondues).....</u>	76
<u>Figure 21 Distribution de la fonction respiratoire dans la cohorte. A. Distribution du Z-score de Kulich. B. Distribution du VEMS en pourcentage prédit en fonction de l'âge.....</u>	86
<u>Figure 22 Effets de l'haplotype ancestral 8.1AH sur la fonction respiratoire mesurée par le VEMS chez des patients français F508del homozygotes</u>	86
<u>Figure 23 Comparaison des taux plasmatiques de sRAGE chez des sujets sains volontaires et des patients atteints de mucoviscidose.....</u>	112
<u>Figure 24 Répartition des taux plasmatiques de sRAGE selon l'âge chez les patients atteints de mucoviscidose</u>	112
<u>Figure 25 Taux plasmatiques de HMGB1 chez des patients atteints de mucoviscidose et des sujets sains.....</u>	113
<u>Figure 26 Culture de fibroblastes à partir d'explants dermiques</u>	116
<u>Figure 27 Comparaison des taux d'ARNm mesuré dans les fibroblastes, en fonction de leur génotype et en présence ou non d'actinomycine D.....</u>	118
<u>Figure 28 Dosages plasmatique du TNF-α chez 46 enfants en fonction de la présence du polymorphisme TNF -308A/G.....</u>	119
<u>Figure 29 Corrélation des taux plasmatiques de sRAGE et de TNF-α dans la mucoviscidose (p=0,01)</u>	120
<u>Figure 30 Recherche de site d'épissage à l'aide du site Human Splicing Finder.....</u>	122
<u>Figure 31 Apparition de nouveau site silencer en présence du variant.....</u>	123
<u>Figure 32 Disparition de site enhancer en présence du variant</u>	123
<u>Figure 33 Effet de l'haplotype ancestral AH8.1 et des gènes qui le composent.....</u>	131

Tableaux

<u>Tableau 1 Tableau récapitulatif des principaux gènes modificateurs.....</u>	32
<u>Tableau 2 Anomalies immunologiques observées en présence de l'haplotype ancestral AH8.1.....</u>	55
<u>Tableau 3 Caractéristiques épidémiologiques de la cohorte européenne de patients</u>	75
<u>Tableau 4 Caractéristiques épidémiologiques et génotypiques de la cohorte homogène F508del.....</u>	85

<u>Tableau 5 Caractéristiques épidémiologiques et génotypiques des patients sévères non F508del homozygotes</u>	87
<u>Tableau 6 Répartition du génotype de AGER -429T/C</u>	90
<u>Tableau 7 Données épidémiologiques de la population de témoins et de patients atteints de mucoviscidose ayant eu un dosage de sRAGE</u>	111
<u>Tableau 8 Génotypage de l'haplotype AH8.1 à partir des fibroblastes de 6 patients</u>	117

INTRODUCTION

1. Généralités sur la mucoviscidose

La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive létale la plus fréquente dans la population d'origine caucasienne. Mucoviscidose, également appelé fibrose kystique, signifie « mucus visqueux ». C'est une maladie qui touche l'ensemble des épithélia glandulaires de l'organisme.

1.1 Historique

La mucoviscidose fut décrite pour la première fois en 1936 par le Dr G. Fanconi sous les termes de « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie » alors que la pédiatre américaine D.H. Andersen en 1938 a donné la description anatomo-pathologique complète. Cette maladie, déjà connue depuis le moyen âge, était appelée la maladie du « baiser salé », car il avait été identifié que le gout salé laissé par un baiser sur le front d'un enfant présageait d'un décès prématuré du nouveau-né. En 1953, le Dr P. Di Sant' Agnese décrivit les anomalies électrolytiques dans la sueur des malades, avec notamment un excès de chlorure (Cl⁻). Cette découverte va permettre la mise au point d'un outil de diagnostic de la maladie : le test de la sueur, le plus fiable pour poser le diagnostic. Dans les années 80, deux équipes ont étudié la physiopathologie de cette maladie. Knowles et al. ont d'abord décrit une différence de potentiel (ddp) électrique au niveau de la muqueuse nasale entre les patients atteints de mucoviscidose et des témoins, secondaire à une réabsorption anormale de sodium (Na⁺) entraînant une déshydratation des mucus (Knowles et al. 1995). Deux ans plus tard, Quinton a décrit le défaut de perméabilité aux ions chlorures affectant les cellules épithéliales des glandes sudoripares.

La protéine défectueuse à l'origine de la mucoviscidose est restée longtemps inconnue. Une technique de "génétique inverse" (ou clonage positionnel), qui permet de découvrir le gène sans connaître la protéine, a été utilisée. En 1985, Tsui et al. localisent le gène sur le bras long du chromosome 7, en position 7q31 (Tsui et al. 1985). En 1989, les équipes des Tsui, Collins et Riordan localisent et caractérisent le gène de la mucoviscidose et le nomment *CFTR* pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (Tsui et al. 1985).

1.2. Gène et protéine CFTR

Le gène *CFTR* code pour un canal chlorure inséré dans la membrane cytoplasmique au pôle apical des cellules épithéliales et dont la fonction est de réguler le transport de chlore à

travers la membrane. Il s'agit d'un grand gène de ~250 000 paires de bases réparties en 27 exons et codant pour un acide ribonucléique messager (ARNm) de 6,5 kb. La protéine CFTR est une protéine membranaire de 1 480 acides aminés, de poids moléculaire compris entre 140 et 180 kiloDaltons (kDa) en fonction des glycosylations post-traductionnelles. Elle appartient à la famille des protéines ATP-Binding Cassette (ABC). La superfamille des ABC regroupe des protéines transmembranaires impliquées dans le transport de molécules de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. Les membres de cette famille possèdent une forte homologie de séquence et utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

La protéine CFTR est composée de 5 domaines (Figure 1) :

- Deux motifs transmembranaires composés chacun de 6 hélices α -hydrophobes
- Deux domaines hydrophiles de fixation des nucléotides (nucléotide binding domain (NBD) 1 et NBD2) capables de fixer de l'adénosine triphosphate (ATP)
- Un domaine hydrophile cytoplasmique de régulation (domaine régulateur R) qui relie les domaines NBD1 et NBD2. Le domaine régulateur R permet de contrôler l'ouverture et la fermeture du canal en exposant à sa surface plusieurs sérines phosphorylables par les protéines kinases A (PKA) et C.

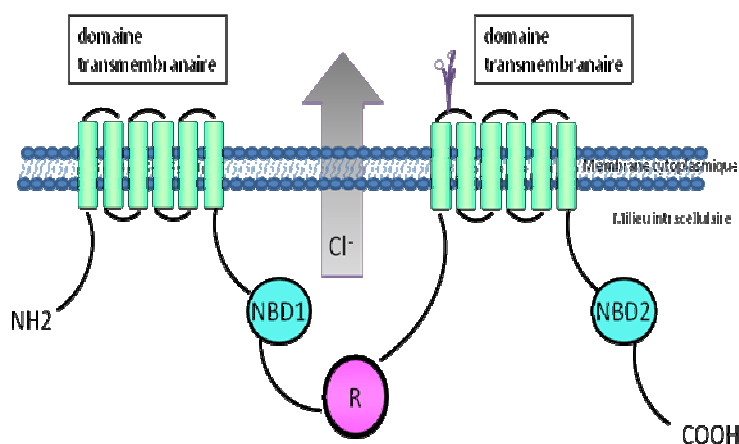


Figure 1 Structure prédictive de la protéine CFTR

CFTR est un canal laissant passer les ions chlorures selon leur gradient électrochimique. L'activation du canal est régulée par des phénomènes de phosphorylation du domaine régulateur R et par l'hydrolyse de l'ATP du domaine NBD en position N-terminal. La phosphorylation de résidus sérine du domaine R sous l'action des kinases permet l'activation de CFTR. Tant que le domaine R est phosphorylé, le canal CFTR est actif, il est en position ouvert lorsque l'ATP est hydrolysée par NBD1 et fermé lorsque l'ATP est hydrolysée par

NBD2. Enfin, lorsque les phosphatases déphosphorylent le domaine R, le canal CFTR devient inactif et retourne à l'état de repos.

Chez l'Homme, l'expression pulmonaire de CFTR varie en fonction du type cellulaire. Elle est fortement exprimée au pôle apical des cellules ciliées de l'épithélium bronchique, dans les cellules de Clara pour les bronches distales et dans les pneumocytes de type II au niveau alvéolaire.

La protéine CFTR régule également d'autres canaux ioniques, tels que l'activation du canal chlorure ORCC (Outward Rectifying Chloride Channel) ainsi que celle de canaux potassiques baso-latéraux ROMK (Renal Outer Medullary potassium) (Figure 2). L'activation de CFTR provoque une activation des canaux $\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$ par l'intermédiaire de l'ATP, ainsi que l'inhibition des canaux ENaC (Epithelial sodic Channel, canaux sodiques sensibles à l'amiloride) entraînant une hyperabsorption du sodium. Outre son rôle dans la régulation des canaux, elle participe également au transport d'ATP, au fonctionnement d'enzymes impliquées dans les phénomènes d'exocytose et endocytose ou à la régulation du pH intracellulaire.

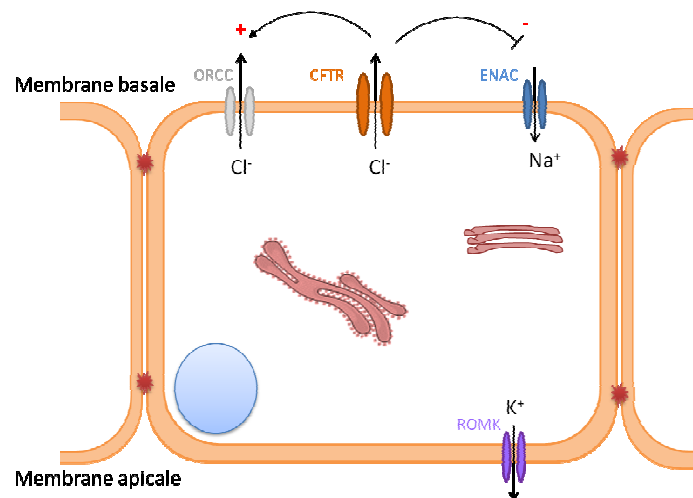


Figure 2 Schéma d'un épithélium sécrétoire centré sur CFTR, protéine multifonctionnelle

Le défaut de CFTR a également un rôle dans le transport de glutathion (GSH) pouvant ainsi contribuer à l'inflammation excessive observée dans la mucoviscidose. Enfin, il est maintenant établi qu'elle joue un rôle important dans la réponse immuno-inflammatoire locale et dans la défense antimicrobienne. Le *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), germe opportuniste qui constitue un des tournants de la maladie (Emerson et al. 2002), s'installe dans le tissu pulmonaire sous forme d'un biofilm, qui lui confère une résistance vis-à-vis des

mécanismes de défense immunitaire (Bjarnsholt et al. 2009; Hoiby et al. 2010). La formation de ce biofilm est un des éléments qui permet la transition du *P. aeruginosa* non mucoïde vers une forme mucoïde résistante à la phagocytose (Baltimore and Mitchell 1980; Marty et al. 1998) et aux traitements. La mutation de *CFTR* favorise la formation de ce biofilm, en partie en augmentant la biodisponibilité du fer dans le liquide de surface des voies aériennes respiratoires (Moreau-Marquis et al. 2008).

1.3. Mutations du gène *CFTR*

Près de 1 900 mutations du gène *CFTR* sont décrites actuellement. Les plus fréquentes sont les mutations faux-sens (40%), suivies des mutations par décalage du cadre de lecture (frameshift-16%), des mutations sur le site d'épissage (12%), des mutations non-sens (8%) (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). En fonction de leurs répercussions, on parle de mutations sévères ou modérées ; les mutations de classe 1, 2 et 3 sont des mutations sévères alors que celles des classes 4, 5 et 6 sont modérées.

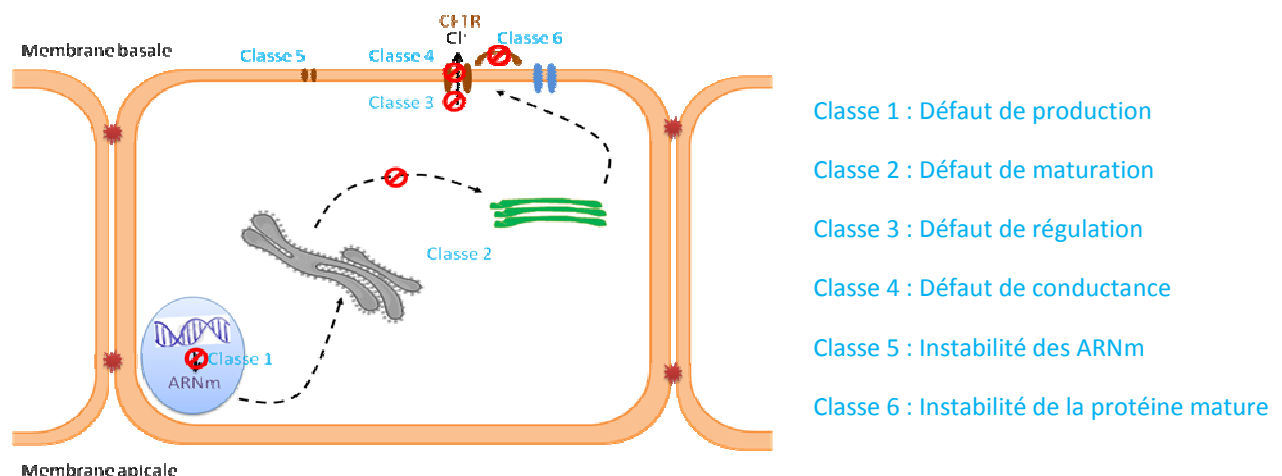


Figure 3 Différentes classes de mutations du gène *CFTR*

Ces mutations peuvent être regroupées en 6 classes selon leurs conséquences fonctionnelles (Figure 3), entraînant une grande variabilité des manifestations cliniques et influençant l'évolution de la maladie :

- **Classe I** : mutations altérant la production de la protéine. Ces mutations résultent en une perte de fonction, liée à un défaut de synthèse. Il n'y a pas de transcription du gène en ARNm stable. Cette classe inclut les mutations non-sens et celles qui produisent un codon stop prématuré (anomalies d'épissage et mutations décalant la phase de lecture). Dans certains cas (R553X), l'ARNm muté est instable et ne produit pas de protéine (Hamosh et al.

1991). Dans les autres cas, la protéine anormale produite est instable et rapidement dégradée.

- Classe II : mutations perturbant le processus de maturation cellulaire de la protéine. De nombreuses mutations altèrent la maturation de la protéine et son ciblage vers la membrane plasmique. La protéine mutante n'est donc pas adressée au bon endroit, en général elle reste localisée dans le cytoplasme. Ainsi, la protéine est soit absente, soit présente en quantité réduite dans la membrane apicale. Les mutations de cette classe représentent la majorité des anomalies observées, notamment la mutation p.Phe508del ou F508del. Elle correspond à la délétion de 3 nucléotides au niveau du 11^{ème} exon du gène, aboutissant à l'élimination d'une phénylalanine en position 508 de la protéine. Il en résulte une anomalie de glycosylation de la protéine CFTR à l'origine d'un défaut d'adressage vers la membrane apicale des cellules (Cheng et al. 1990), entraînant un canal chlorure non fonctionnel et dégradé par le protéasome de la cellule. Sa fréquence est variable dans les différents pays suivant un gradient nord-ouest/sud-est en Europe. Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer cette fréquence élevée dans les populations nord-européennes (Fanen 1999). Il pourrait s'agir d'un effet fondateur (un seul événement mutationnel survenu dans le passé) ou d'un avantage sélectif des hétérozygotes (Baxter et al. 1988; Morral et al. 1994). En effet, les hétérozygotes seraient protégés contre la déperdition hydro-sodée au cours des diarrhées dues à des toxines bactériennes (Baxter et al. 1988). De plus, *CFTR* F508del diminuerait la perméabilité de l'épithélium intestinal aux germes pathogènes, assurant une protection vis à vis de l'infection (Pier et al. 1998).

- Classe III : mutations perturbant la régulation du canal Cl⁻, les protéines mutées sont présentes à la membrane apicale. Ces mutants sont correctement synthétisés et localisés, mais ne peuvent pas être activés ou ont une fonction de canal Cl⁻ anormale. Ces mutations sont le plus souvent des mutations faux-sens localisées dans les exons et qui codent pour les domaines de liaison et d'hydrolyse de l'ATP (NBD). Par exemple, les mutations G551D et G551S situées dans le domaine NBD1 ou S1255P et G1349D dans le domaine NBD2, modifient la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ainsi que la phosphorylation du domaine R.

- Classe IV : mutations altérant la conduction et les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal Cl⁻. Certaines sont localisées dans les domaines transmembranaires formant le pore du canal. Les mutations faux-sens situées dans ces régions produisent une protéine correctement positionnée qui présente une activité canal Cl⁻-AMPc dépendante. Mais les caractéristiques de ces canaux sont différentes de celles du canal CFTR endogène avec une

diminution du flux d'ions et une sélectivité modifiée. Les mutations R117H appartiennent à cette classe.

- Classe V : mutations altérant la stabilité de l'ARNm *CFTR*. Ces mutations influencent la quantité d'ARNm, ainsi que la quantité de protéines fonctionnelles. Cette classe inclut des mutations dans le promoteur et des mutations qui modifient l'épissage alternatif, comme les mutations 3849+10kb C → T et A455E ou provoquent une synthèse de protéine non fonctionnelle. Le polymorphisme T5 de l'intron 8 fait également partie des mutations de classe V.

- Classe VI : mutations altérant la stabilité de la protéine mature et donc perturbant la régulation des autres canaux par CFTR (Pilewski and Frizzell 1999). Ce sont principalement des mutations générant des protéines tronquées dans leur partie C-terminale comme Q1412X et 4326delTC.

1.4. Méthodes diagnostiques

Les critères diagnostiques de la mucoviscidose ont été définis lors de la conférence de consensus américaine de 1998 (Rosenstein and Cutting 1998). Le diagnostic repose sur l'association de signes cliniques (signes cliniques évocateurs, antécédent de mucoviscidose dans la fratrie, test de dépistage néonatal positif) et d'un test de la sueur positif à 2 reprises ($Cl^- > 60$ mmol/l) et/ou la présence de 2 mutations du gène *CFTR*.

Au cours de l'année 2002, en France, a été mis en place le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose au niveau national pour permettre un diagnostic précoce et une prise en charge optimale dans les centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM). Ce dépistage repose sur le dosage de trypsine immuno-réactive (TIR) à partir d'un échantillon de sang prélevé sur papier buvard au 3^{ème} jour de vie et dosé selon la technique mise au point par Crossley et al. (Crossley et al. 1979). Afin de limiter le nombre de faux positifs, le dosage de la TIR est couplé à la recherche des 31 principales mutations du gène *CFTR*. En cas de résultat supérieur au seuil ($> 60 \mu g/l$), les enfants sont alors convoqués par les CRCM pour réaliser le test diagnostic : le test de la sueur.

Le test de la sueur, principal test diagnostique de cette pathologie, est positif dans 98% des cas (HAS 2006). Il consiste en un dosage de la concentration en chlore de la sueur des patients. Les techniques utilisées actuellement sont simples mais le facteur limitant est la quantité de sueur recueillie qui peut être insuffisante chez le nourrisson de moins de deux mois,

nécessitant un contrôle ultérieur. Un test de la sueur retrouvant une concentration de chlore supérieure à 60mmol/L est en faveur d'une mucoviscidose et doit être contrôlé pour confirmer le diagnostic. La concentration normale doit être inférieure à 40 mmol/L. En cas de taux intermédiaire, situé entre 40 et 60mmol/L, l'interprétation est douteuse et un contrôle s'avère nécessaire. Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'absorption de chlore par les canaux excréteurs des glandes sudoripares est impossible car l'altération de CFTR rend la couche épithéliale imperméable au chlore. Dans ces conditions, l'absorption de sodium ne peut plus se produire et la sueur est trop riche en sel (NaCl). On ne teste que la concentration en chlorure qui est plus sensible que celle en sodium (Green et al. 1985).

Une autre technique mise au point par Knowles (Knowles et al. 1995) consiste à mesurer la ddp de l'épithélium qui existe entre la peau et la muqueuse nasale, explorant ainsi les transports ioniques transépithéliaux. Cette valeur est significativement augmentée en cas de mucoviscidose, reflétant une absorption accrue de sodium. La ddp nasale n'est pas corrélée avec le test de la sueur. Le principal intérêt de cette technique est d'apporter une aide au diagnostic dans les formes atypiques avec des tests de la sueur intermédiaires. L'examen est simple et bien toléré mais les résultats sont difficilement interprétables en cas d'inflammation de la muqueuse nasale ou en présence de polypes nasaux.

Le génotypage par analyse génétique, devenu systématique en France, vise à rechercher la présence de mutations du gène *CFTR*.

1.5. Manifestations cliniques

Le dysfonctionnement des canaux CFTR est responsable de la déshydratation et de l'hyperviscosité du liquide de surface tapissant l'épithélium bronchique, entraînant une mauvaise clairance muco-ciliaire. L'ensemble des glandes exocrines (glandes sudoripares, pancréas,...) de l'organisme est atteint. La présentation clinique de la mucoviscidose est très hétérogène entre différentes familles ainsi qu'au sein d'une même famille.

En France, un nouveau-né sur 4600 est atteint par la mucoviscidose. Dès la naissance, il peut survenir un iléus méconial dans 10 à 20% des cas. Cet iléus méconial correspond à une occlusion intestinale basse néonatale qui se traduit par l'absence d'émission du méconium les premiers jours de vie. Plus tard, la forme clinique la plus fréquente associe des troubles respiratoires à des troubles digestifs et de la croissance staturo-pondérale.

Manifestations pulmonaires

La cause principale de morbidité et mortalité est l'atteinte pulmonaire. La déshydratation des sécrétions bronchiques entraîne une altération de la clairance muco-ciliaire et une

obstruction chronique des bronchioles par un mucus épais. Cette obstruction évolue rapidement vers une inflammation bronchique excessive et des infections à répétition. Ceci explique en partie les infections répétées à germes opportunistes, d'abord *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) puis *P. aeruginosa*, bactérie naturellement résistante à de nombreux antibiotiques et qui devient le principal agent pathogène des voies respiratoires. Les symptômes initiaux associent des bronchites récidivantes à une toux grasse, productive et perannuelle. L'évolution se fait par poussées, responsables d'une dégradation progressive de l'épithélium respiratoire, aboutissant à une insuffisance respiratoire terminale.

Manifestations pancréatiques et digestives

En dehors de l'iléus méconial de survenue néonatale, il survient une insuffisance pancréatique exocrine (IPE) chez 85-90% des patients. Cette insuffisance pancréatique est liée à un défaut d'excrétion dans la lumière intestinale de trypsine et de lipase, du fait d'une obstruction des canaux pancréatiques par des sécrétions trop épaisses et de la dégénération du tissu pancréatique. Elle est responsable d'un défaut d'absorption des graisses et des vitamines liposolubles (A, D, E, K). La malabsorption est responsable d'une stéatorrhée (diarrhée grasseuse) et un retard de croissance staturo-pondérale. L'état de la fonction pancréatique exocrine, déficiente ou conservée (SPE : Suffisance Pancréatique Exocrine), permet d'apprécier la gravité du phénotype des patients : phénotype grave dans le premier cas ou modéré dans le second. En effet, l'absence d'IPE est fortement liée à la génétique et est associée aux mutations modérées de classe 4, 5 ou 6.

Autres manifestations

L'atteinte hépatobiliaire est fréquente avec une hépatomégalie et peut évoluer vers une insuffisance hépatique dans environ 10% des cas. Cette symptomatologie est liée à une élévation de la viscosité de la bile et une obstruction des canaux hépatiques. La lésion hépatique pathognomonique de la mucoviscidose est la cirrhose biliaire focale.

Les manifestations génitales se traduisent chez la femme par une hypofertilité liée à des modifications de la glaire cervicale. Chez l'homme, il existe une agénésie bilatérale des canaux déférents entraînant une azoospermie et une stérilité.

Les désordres hydro-électrolytiques au niveau des glandes sudoripares peuvent être responsables d'un syndrome de perte de sel avec une déshydratation aiguë lors d'efforts physiques importants ou de fortes chaleurs.

1.6. Explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) dans la mucoviscidose

Les EFR permettent de caractériser un trouble ventilatoire (obstructif, restrictif ou mixte) et de suivre l'évolution des pathologies respiratoires dont la mucoviscidose. La fonction pulmonaire dans la mucoviscidose est principalement évaluée par la mesure du volume expiré maximal par seconde (VEMS), paramètre reflétant le degré d'obstruction et corrélé à la survie (Kerem et al. 1992; Schluchter et al. 2002). L'examen consiste à faire souffler le patient le plus fort possible à travers un embout placé dans la bouche. Le VEMS correspond au volume maximal d'air en litres qu'un sujet peut expirer dans la première seconde qui suit une inspiration forcée. L'embout est relié à un spiromètre qui permet de dessiner des courbes, qui seront comparées à des valeurs de référence en fonction de l'âge, du sexe, de la taille et du poids du patient. Elles permettent l'étude de volumes et de débits respiratoires.

La spirométrie permet d'évaluer les volumes pulmonaires mobilisables, notamment le VEMS. Dans les années 1970, l'équipe de Knudson a cherché à établir des normes pour les paramètres mesurés à l'aide de la courbe débit-volume (Knudson et al. 1976). Ainsi, des équations de régression ont été établies chez des sujets sains de référence en fonction de l'âge, du sexe et de la taille. La fonction pulmonaire est alors exprimée en % de la valeur prédite, établie dans cette population témoin pour l'âge, le sexe et la taille. Des normes ont alors été mises en place pour différentes classes d'âge et ethnies (caucasien, latino-américains, afro-américains,...) (Knudson et al. 1983; Hankinson et al. 1999). L'utilisation de valeurs prédites permet de réaliser des comparaisons entre individus mais également chez un même individu en croissance. Cependant, comparer la fonction respiratoire de patients atteints de mucoviscidose à une population témoin de référence présente un certain nombre de limitations, la plus importante étant que la référence n'est pas pertinente dans ce contexte.

Ainsi, l'équipe nord-américaine de Kulich a évoqué des difficultés à comparer des sujets sains à des sujets atteints de mucoviscidose (Kulich et al. 2005). Tout d'abord, les enfants ayant la mucoviscidose ont le plus souvent des troubles digestifs et un retentissement sur la croissance staturo-pondérale, ce qui modifie les courbes de taille en fonction de l'âge par rapport à des enfants sains. De plus, ces enfants présentent un retard pubertaire modifiant également la corrélation entre la taille et la fonction pulmonaire. Des équations spécifiques à la mucoviscidose ont donc été proposées, où les individus sont comparés non plus à une population de sujets sains mais à une population de sujets atteints de mucoviscidose. Les résultats sont alors exprimés en percentiles du VEMS ajusté sur l'âge, le sexe et la taille. Ces percentiles permettent la comparaison des patients atteints de mucoviscidose entre eux.

Bien que ces valeurs soient ajustées à la mucoviscidose, elles restent imprécises, car tiennent uniquement compte des individus vivants, excluant les patients décédés, le plus souvent suite à la morbidité pulmonaire. L'équipe de Taylor a récemment proposé d'ajuster l'équation de Kulich à la mortalité, aboutissant ainsi au score KNoRMA (Kulich Normal Residual Mortality-Adjusted) (Taylor et al. 2011). Tout comme le consortium nord-américain des gènes modificateurs, nous utilisons dorénavant ce type de mesures standardisées afin de mieux définir le phénotype respiratoire des patients pour les études d'associations génotype / phénotype.

1.7. Principes de traitement

Les progrès dans la prise en charge, avec notamment la mise en place des CRCM et l'amélioration des thérapeutiques, ont permis d'augmenter l'espérance de vie, qui est de 46 ans pour les enfants nés en 2008.

Il n'existe pas à ce jour de traitement curatif de la maladie. La prise en charge consiste en un traitement symptomatique.

1.7.1. Prise en charge de l'atteinte digestive

Prise en charge nutritionnelle

Une dénutrition est observée dans la mucoviscidose du fait d'une diminution des ingestats et d'une augmentation des pertes. La diminution des ingestats est secondaire à l'IPE et à une anorexie favorisée par l'encombrement, les douleurs abdominales, les prises médicamenteuses, etc. L'augmentation des pertes est secondaire à l'inflammation et à l'augmentation du travail musculaire. Une prise en charge nutritionnelle avec un enrichissement des apports est le plus souvent nécessaire avec l'évolution de la maladie.

Insuffisance pancréatique exocrine

L'IPE touche 85-90% des patients, ce qui nécessite une supplémentation en extraits pancréatiques administrés par voie orale lors de chaque repas et adaptés en fonction des repas et des symptômes digestifs.

Supplément vitaminique

L'IPE est associée à une malabsorption des vitamines liposolubles (A, D, E, K), il existe également un déficit en vitamine B12 et en zinc. Les patients reçoivent alors des compléments vitaminiques et des oligoéléments pour compenser ces pertes.

1.7.2. Prise en charge de l'atteinte pulmonaire

Amélioration de la clairance mucociliaire

L'altération de la clairance mucociliaire favorise la survenue d'infections et participe à la destruction du parenchyme pulmonaire. La kinésithérapie respiratoire est systématique dès que le diagnostic est posé, même en l'absence de symptômes.

Des mucolytiques peuvent être administrés aux patients afin de fluidifier les sécrétions. Des aérosols de désoxyribonucléase recombinante humaine (rhDNase ou dornase alpha ou Pulmozyme®) permettent d'hydrolyser de grandes quantités d'ADN issu notamment des polynucléaires et des bactéries du site inflammatoire. Ce traitement permet de diminuer la viscosité du mucus pulmonaire, améliorant ainsi la fonction pulmonaire, et pourrait même prévenir l'inflammation pulmonaire (Quan et al. 2001). Des nourrissons traités par rhDNase présentent une diminution des valeurs de matrix métalloprotéinases (MMP) 8 et MMP9, ainsi qu'une diminution du rapport MMP9 / tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP1) (Ratjen et al. 2002).

Par leur effet osmotique, l'inhalation de sérum salé hypertonique pourrait également favoriser l'hydratation du mucus et améliorer la clairance mucociliaire (Wills et al. 1997; Elkins et al. 2006). Le sérum salé hypertonique, moins efficace que la dornase, est indiqué en seconde ligne en cas d'échec ou d'intolérance du pulmozyme® (HAS 2008). Des aérosols de mannitol ont également été proposés pour leur pouvoir osmotique, mais ils ne sont pas commercialisés en France.

Antibiothérapie

L'antibiothérapie doit être précoce, débutée dès l'apparition de signes d'exacerbation pulmonaire. Des examens cyto bactériologiques des crachats (ECBC) sont systématiquement réalisés. Ils permettent d'isoler des germes et d'évaluer leur sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) pour ainsi mettre en route une antibiothérapie ciblée sur le germe.

Dans un premier temps, l'antibiothérapie vise principalement le *S. aureus* et l'*H. Influenzae* souvent traités par voie orale. En cas d'infection au *P. aeruginosa*, la primocolonisation pourra être traitée soit par une antibiothérapie orale et inhalée, soit par voie veineuse selon les signes cliniques. Il a été démontré qu'une prise en charge précoce permet d'éradiquer le pathogène de l'organisme et ainsi de retarder la colonisation chronique (Taccetti et al. 2005). En cas d'infection chronique, les exacerbations seront traitées par voie veineuse.

Concernant les autres infections, le choix de l'antibiothérapie sera fonction du germe, des symptômes et de l'antibiogramme.

Anti-inflammatoires

Très rapidement, il apparaît un cercle vicieux dans la mucoviscidose impliquant l'inflammation, l'infection et la libération de dérivés oxydants. Un des enjeux de la thérapeutique est de rompre ce cercle vicieux, c'est pourquoi des anti-inflammatoires et anti-oxydants sont apparus comme des traitements de choix.

Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

De fortes doses d'ibuprofène sont associées à un ralentissement du déclin du VEMS, principalement chez des enfants ayant une atteinte modérée (Konstan et al. 1995). Mais les fréquents effets secondaires gastriques et rénaux ont conduit à l'abandon de ces traitements.

Corticothérapie

Les corticoïdes sont connus pour leur rôle anti-inflammatoire en diminuant le recrutement des neutrophiles et la libération de cytokines. Un effet bénéfique des corticoïdes par voie systémique a été rapporté chez des enfants présentant une forme modérée de mucoviscidose, avec une amélioration de la fonction respiratoire et une réduction de la fréquence des exacerbations. Toutefois, ces bénéfices sont ternis par des effets secondaires notables (Eigen et al. 1995). Ainsi, les corticoïdes par voie systémique ne sont pas utilisés, en dehors des aspergilloses broncho-pulmonaires immunoallergiques (ABPA) et des exacerbations sévères. Concernant les corticoïdes inhalés, ils font l'objet de controverse mais restent néanmoins très souvent prescrits dans le cadre de la mucoviscidose. Une revue de la Cochrane n'a pas pu établir l'effet bénéfique ou délétère de ces thérapeutiques dans la mucoviscidose (Dezateux et al. 2000).

Macrolides

Les macrolides sont des antibiotiques utilisés pour leur action antibactérienne contre les germes intracellulaires. L'un d'entre eux, l'azithromycine, a particulièrement été étudié dans la mucoviscidose pour son rôle anti-inflammatoire. Une méta-analyse a regroupé les études randomisées réalisées sur les macrolides dans cette pathologie (Cai et al. 2011). Les auteurs concluent que l'azithromycine permettrait une augmentation significative du VEMS, reflet de la fonction respiratoire, essentiellement chez les patients colonisés par le *P. aeruginosa*. Ils ne montrent pas de diminution du nombre d'exacerbations, mais les patients sous azithromycine nécessitent moins de recours à une antibiothérapie orale et ont une meilleure qualité de vie.

Nouvelles voies thérapeutiques

Plusieurs molécules sont actuellement à l'étude pour rétablir la fonctionnalité du canal CFTR.

Le vertex 770 (ivacaftor ®) est un potentiateur de la protéine CFTR utilisé en présence de mutation de classe III. Ce traitement a fait l'objet d'une étude randomisée en double aveugle contre placebo chez des sujets porteurs de la mutation de classe III G551D. Les patients recevant l'ivacaftor ont présenté une amélioration rapide et très significative du VEMS, une diminution de plus de moitié du nombre d'exacerbations et un gain pondéral sans effet secondaire notable. Face à ces résultats très encourageants, cette molécule sera très prochainement commercialisée (Ramsey et al. 2011).

Le vertex 809 est quant à lui un correcteur de la protéine CFTR et pourrait être utile en présence de mutations de classe II en traitement combiné avec le vertex 770. Dans des cultures cellulaires bronchiques de patients homozygotes pour la mutation F508del, le vertex 809 améliore la maturation dans le réticulum endoplasmique et augmente la sécrétion de Cl⁻ d'environ 14% (Van Goor et al. 2011).

La molécule PTC124 (Ataluren ®) pourrait restaurer partiellement la production de CFTR en présence d'une mutation non-sens, en poursuivant le cadre de lecture malgré le codon stop (Welch et al. 2007). Cette molécule a fait l'objet d'études chez la souris dans un premier temps, chez qui PTC124 induit la production de CFTR fonctionnel à la surface des cellules épithéliales (Du et al. 2008). Des essais cliniques ont ensuite été réalisés chez l'adulte sain (Hirawat et al. 2007) puis chez des adultes atteints de mucoviscidose (Kerem et al. 2008). L'Altaluren® permettrait alors une amélioration du transport de Cl⁻ dans des épithélia respiratoires. Ces résultats ont ensuite été confirmés chez l'enfant (Sermet-Gaudelus et al. 2010).

Ces molécules font actuellement l'objet d'études pharmacologiques à des fins thérapeutiques. La thérapie génique, qui apparaît comme le meilleur traitement de la mucoviscidose est elle aussi à l'état de recherche.

2. Caractéristiques de l'atteinte inflammatoire dans la mucoviscidose

Parmi les facteurs impliqués dans l'aggravation progressive de l'insuffisance respiratoire chronique dans la mucoviscidose, l'inflammation des voies respiratoires apparaît comme un élément important. L'origine de cette inflammation reste largement débattue (Boucher 2004) : secondaire au déficit en CFTR ou aux infections pulmonaires (Armstrong et al. 1995; Gangell et al. 2011).

2.1. Inflammation respiratoire précoce

L'inflammation des voies aériennes dans la mucoviscidose est caractérisée par un afflux de polynucléaires neutrophiles (Midulla et al. 1995; Sly et al. 2009). Certaines données suggèrent que la cascade d'événements associée à la progression de la maladie implique tout d'abord le déclenchement d'une inflammation pulmonaire et secondairement l'apparition d'une infection des voies respiratoires. Chez des souris avec ou sans mucoviscidose, une greffe de tissu trachéal humain a montré la survenue plus précoce d'un afflux massif de leucocytes et d'une croissance bactérienne (Tirouvanziam et al. 2000). De plus, l'analyse de liquides de lavage bronchoalvéolaire (LBA) de très jeunes patients a permis de mettre en évidence la présence de marqueurs d'inflammation dans les voies respiratoires, avec, outre les neutrophiles, une activité élastasique accrue et un taux important d'interleukine (IL)-8 en l'absence de pathogène identifié (Balough et al. 1995; Armstrong et al. 1997; Muhlebach et al. 1999; Dakin et al. 2002). Cette observation a conduit à l'hypothèse qu'il existerait une inflammation d'origine non infectieuse. La présence d'une activation constitutive de NF- κ B dans les cellules épithéliales bronchiques des glandes sous-muqueuses et une augmentation de la production d'IL-8 en présence de la mutation F508del abondent en ce sens (Tabary et al. 1998). Mais la présence d'une corrélation entre le niveau d'inflammation dans les voies aériennes et la charge bactérienne chez les nourrissons suggère que l'infection a un rôle important dans le processus inflammatoire (Dakin et al. 2002).

Les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles, impliqués dans l'immunité innée, ont un rôle de défense contre les pathogènes. Ces cellules sont douées de mobilité et, sous l'influence de stimuli issus de foyers inflammatoires, migrent sur le site de l'inflammation par diapédèse. Elles agissent par phagocytose pour englober le facteur pathogène puis le détruisent par 2 mécanismes synergiques : dégranulation ou explosion oxydative. L'explosion oxydative consiste en la libération rapide d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS, produite par un mécanisme d'oxydation induit par les pathogènes via la NADPH oxydase. La dégranulation des polynucléaires neutrophiles consiste en la libération d'enzymes responsables de la dégradation de la membrane du pathogène, permettant ainsi sa destruction par d'autres enzymes.

Les neutrophiles dans la mucoviscidose

Dans la mucoviscidose, il existe un afflux de polynucléaires neutrophiles dans les voies aériennes respiratoires (Kharazmi et al. 1986). Les polynucléaires en excès libèrent des protéinases délétères pour la matrice extracellulaire ainsi que des ROS. En période

néonatale précoce, le rôle délétère des protéases a été évoqué, du fait de la présence d'un déséquilibre entre protéases et anti protéases dans les voies aériennes (Meyer et al. 1991). La sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires, liée à une dérégulation de la réponse par les neutrophiles dans la mucoviscidose, pourrait participer à cet excès d'inflammation (Coakley et al. 2000). Au total, il s'installe un cercle vicieux entre infection, inflammation et stress oxydant (Figure 4).

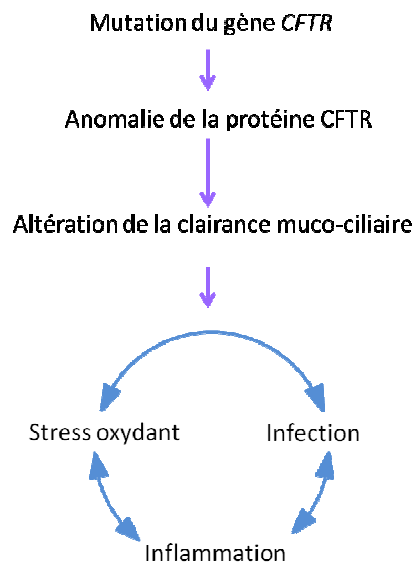


Figure 4 Cercle vicieux infection/inflammation

La présence d'une inflammation précoce est associée à un retentissement plus important de la maladie (Dakin et al. 2002). De plus, l'accumulation de polynucléaires neutrophiles est responsable d'une accumulation d'ADN issu de leur dégradation, ce qui participe à l'hyperviscosité des sécrétions.

2.2. Déséquilibre entre protéases et anti protéases

Ce déséquilibre a également été mis en cause dans la mucoviscidose (Birrer et al. 1994; Rowe et al. 2005). Parmi ces protéases, les matrix métalloprotéases (MMP) ont été impliquées dans l'inflammation pulmonaire chronique (Greenlee et al. 2007). Les MMPs sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, du remodelage tissulaire, du relargage de cytokines ou de facteurs de croissance et de la migration cellulaire (Stamenkovic 2003; Gaggari et al. 2008). Plus de 20 MMPs ont été décrites et peuvent être classées selon leur fonction :

- Collagénase (MMP-1, MMP-8, MMP-13)
- Gélatinase (MMP-9, MMP-2)

- Stromelysine (MMP-3, MMP-10)
- Membrane-type MMP (MT1- MMP, MT2-MMP, MT1-MMP)
- Autres (MMP-7, MMP-11, MMP-12 ou métalloélastase)

Elles peuvent être sécrétées sous forme inactive ou exprimées à la membrane. Les cellules du tractus respiratoire produisent des MMPs, les MMP-8 et MMP-9 des voies aériennes inférieures sont principalement dérivées des neutrophiles qui jouent un rôle central dans la mucoviscidose. Les MMPs sont inactivées par des inhibiteurs spécifiques : les TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinase). Les MMPs des voies aériennes sont augmentées dans la mucoviscidose (Delacourt et al. 1995).

2.3. Dérégulation des voies NF- κ B et AP-1 dans la mucoviscidose

Il a été démontré que les cellules épithéliales ayant un défaut d'expression ou d'activité CFTR ont une expression accrue d'ARNm de l'interleukine (IL)-8 et de la protéine correspondante en présence d'IL-1 β et de TNF- α . La production d'IL-8 est en partie contrôlée par l'activation de NF- κ B (Tabary et al. 2006). Dans un contexte de mucoviscidose, les cellules ont tendance à induire une activation excessive et prolongée la voie NF- κ B après stimulation par l'IL-1 β (Tabary et al. 2006).

De même, une production accrue d'IL-8 est associée à une activation excessive et prolongée du facteur de transcription AP-1 et des MAP kinases (p38, JNK, ERK) (Saadane et al. 2011). Il semble que JNK et ERK jouent un rôle dans la régulation alors que p38 permet de stabiliser l'ARNm de l' IL-8 (Hoffmann et al. 2002).

La production d'IL-8, augmentée dans la mucoviscidose, est dépendante des voies de signalisation NF- κ B et MAPK (Muselet-Charlier et al. 2007).

3. Gènes modificateurs

De nombreuses études ont tenté d'établir un lien entre les mutations de *CFTR* et le phénotype de la maladie. De manière décevante, seules quelques études ont pu mettre en évidence de telles associations, intéressant essentiellement l'atteinte pancréatique et, plus rarement, l'atteinte pulmonaire. Ainsi, il a été montré que les patients porteurs de mutations de *CFTR* dites modérées n'ont pas d'atteinte pancréatique et ont une atteinte respiratoire plus modérée. En dehors de ces exceptions, la grande majorité des études, y compris celles réalisées chez des jumeaux ou dans des fratries, s'accordent à conclure à l'absence de relation entre les mutations de *CFTR* et le phénotype de la maladie (Santis et al. 1990; Mekus et al. 2000; Rowntree and Harris 2003).

Compte tenu de la grande variabilité des profils cliniques des patients atteints de mucoviscidose, ces données suggèrent l'intervention de variants génétiques, situés soit dans le locus même de *CFTR* (facteurs dits hétéroalléliques), soit situés en dehors de ce locus : qui orientent vers la recherche des gènes dits modificateurs. Ces variants génétiques ou polymorphismes, sont des variations individuelles dans la séquence d'un gène, non pathologiques en soit, mais pouvant moduler la gravité de la maladie (Mekus et al. 2000; Rowntree and Harris 2003). On distingue plusieurs types de polymorphismes : des insertions-délétions de bases, des répétitions de courtes séquences nucléotidiques (micro- ou mini-satellite) ou des modifications d'une seule base ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Le choix des gènes étudiés est guidé par leur rôle dans la physiopathologie de la maladie (approche gène-candidat).

3.1. Corrélation phénotype-génotype liée au gène *CFTR*

3.1.1. Corrélation selon les types de mutations de *CFTR*

Depuis la description de la maladie en 1953, de nombreuses observations ont été rapportées documentant l'extrême hétérogénéité clinique de la pathologie. L'identification du gène et de ses principales mutations a permis d'initier un nombre important d'études pour tenter d'établir des liens entre caractéristiques génotypiques et manifestations cliniques (Zielenski 2000; Acton and Wilmott 2001; Drumm 2001; Salvatore et al. 2002; Accurso and Sontag 2003). D'une manière générale, les mutations de classe IV à VI sont associées à des phénotypes dont la sévérité est plus modérée par rapport aux mutations des classes I, II et III. Par ailleurs, chez les patients hétérozygotes composites, l'allèle associé à un phénotype modéré domine le plus souvent l'allèle associé à un phénotype plus sévère. Les hommes adultes hétérozygotes composites pour *CFTR* présentent cliniquement une absence bilatérale des canaux déférents isolée car la mutation qui altère sévèrement la fonction de la protéine CFTR (par exemple F508del) est compensée par une 2^{ème} mutation dont l'effet est plus modéré, le plus souvent affiliée aux classes IV ou V (Rigot et al. 1991).

De façon surprenante, les résultats d'études d'association génotype *CFTR* / phénotype de la mucoviscidose ont été rapidement décevants, ne permettant de retrouver une association que pour un nombre très limité d'expressions phénotypiques, et intéressant surtout l'atteinte du pancréas (The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium 1993). Les patients suffisants pancréatiques sont le plus souvent porteurs de mutations dites modérées qui se caractérisent par une capacité à maintenir un fonctionnement résiduel du canal chlorure (Devoto et al. 1989; Kerem et al. 1989; Gasparini et al. 1990; Ferrari and Cremonesi 1996).

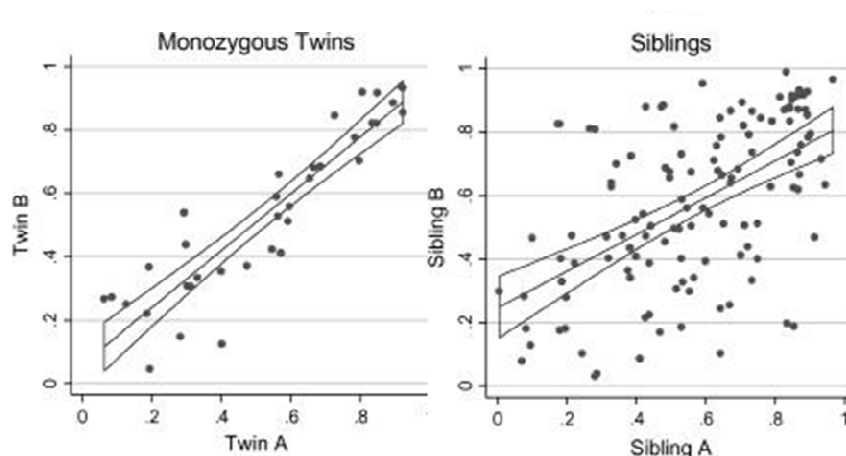
Ainsi, l'état de la fonction pancréatique exocrine, déficiente ou conservée permettrait d'apprécier la gravité du phénotype des patients : phénotype grave dans le premier cas ou modéré dans le second (Kerem et al. 1990). La relation génotype *CFTR*/atteinte pancréatique de la mucoviscidose a été confirmée par des études familiales, des études de fratries et des études de jumeaux monozygotes (MZ) ou dizygotes (DZ) (Corey et al. 1989; Santis et al. 1990; Santis et al. 1992).

Concernant l'atteinte des autres organes, aucune relation n'a pu être établie (Rowntree and Harris 2003). Ainsi, la survenue d'un iléus méconial, qui est observée chez environ 15 % des enfants à la naissance, est retrouvée chez les patients présentant une insuffisance pancréatique, mais sans association avec une mutation particulière. Concernant la pathologie respiratoire qui domine le pronostic, là encore de nombreuses études ont cherché à préciser si certaines mutations de *CFTR* étaient associées à la précocité de l'atteinte pulmonaire, à une progression rapide de la maladie ou encore à la survenue à un âge précoce d'une colonisation pulmonaire par le *P. aeruginosa*. Johansen et al. en 1991 avaient associé l'homozygotie F508del à une atteinte respiratoire sévère (Johansen et al. 1991), mais de nombreuses études ont infirmé leurs résultats (Santis et al. 1990; Campbell et al. 1991; Burke et al. 1992). Certains travaux montrent que les patients porteurs de mutations sévères de *CFTR* seraient plus susceptibles aux infections à *P. aeruginosa* (Kubesch et al. 1993; Davidson et al. 1995). De plus, certaines mutations faux-sens de *CFTR* comme les mutations R117H et A455E ont été associées à des atteintes respiratoires modérées (Gan et al. 1995; De Braekeleer et al. 1997).

En dehors de ces exceptions, l'ensemble des données de la littérature validé par des études réalisées chez des jumeaux et des fratries s'accorde à conclure à l'absence de relation entre atteinte respiratoire et mutations de *CFTR*. Les jumeaux dizygotes (DZ) et monozygotes (MZ) partageant respectivement 50% et 100% de leurs gènes, l'étude des variabilités phénotypiques au sein d'une paire de jumeaux est d'une importance majeure, surtout quand les jumeaux partagent un même environnement. Une première étude réalisée chez un petit nombre de jumeaux atteints de mucoviscidose (3 paires de MZ et 4 de DZ) suggère une meilleure concordance de la sévérité de l'atteinte respiratoire chez les MZ comparés aux DZ (Santis et al. 1992). Des études de fratrie ont également montré des corrélations significatives avec la fonction pulmonaire (VEMS) (Corey et al. 1989; Santis et al. 1990; Picard et al. 2004). Cependant, ces études ne font pas la différence entre les similitudes dues au partage des gènes, au partage des facteurs environnementaux ou d'une combinaison des 2. Une étude de l'« European Cystic Fibrosis (CF) Twin and Sibling Study » réalisée chez des jumeaux et au sein de fratries atteints de mucoviscidose (29 MZ, 12 DZ,

277 paires d'une fratrie) a montré que les jumeaux MZ avaient moins de différences phénotypiques respiratoire (VEMS exprimé en % des valeurs attendues pour l'âge) et nutritionnelle (poids attendu pour la taille) que les jumeaux DZ (Mekus et al. 2000). Cette différence n'est pas statistiquement significative lorsque la fonction respiratoire est testée isolément. De façon surprenante, la médiane de la fonction pulmonaire était statistiquement différente entre les 2 groupes de jumeaux MZ et DZ, avec une fonction respiratoire plus sévère chez les jumeaux DZ. Cette différence ne peut pas être attribuée à l'âge car les analyses ont été ajustées en fonction de l'âge et que les âges médians des 2 groupes étaient similaires (14,9 ans pour les MZ et 14,6 ans pour les DZ). Ainsi, chez les patients homozygotes F508del, le fait de partager des gènes et un environnement augmente la concordance du statut nutritionnel et non du statut respiratoire. A l'inverse, chez les patients non homozygotes F508del, le partage de gènes et d'environnement est associé à plus de similitude de l'atteinte respiratoire. Ces résultats suggèrent que la sévérité de l'atteinte respiratoire est déterminée par des interactions entre le génotype *CFTR* et des facteurs partagés par les jumeaux et les fratries comme des gènes modificateurs et/ou des facteurs environnementaux.

Une étude américaine « CF Twin and Sibling Study », sur une plus grande cohorte de patients, a également été réalisée avec 47 paires de jumeaux MZ, 10 DZ et 231 paires de fratrie (Vanscoy et al. 2007). L'analyse a montré que les mesures de la fonction respiratoire chez les jumeaux MZ sont mieux corrélées, que chez des jumeaux DZ ou des fratries. Ces résultats sont en faveur de l'intervention de facteurs génétiques, des gènes modificateurs. Néanmoins, la corrélation des mesures de la fonction chez les MZ n'atteint pas 100%, suggérant l'intervention de facteurs environnementaux ou stochastiques. Selon l'étude de Collaco et al, les variations du phénotype respiratoire seraient dues pour moitié à des gènes modificateurs et pour moitié à des facteurs environnementaux (collaco et al. 2010).



[Figure 5 Meilleure corrélation de la fonction respiratoire chez les jumeaux MZ par rapport aux fratries \(Vanscoy et al. 2007\)](#)

Certaines études ont cherché à mettre en évidence des facteurs environnementaux qui pourraient moduler le phénotype des patients atteints de mucoviscidose malgré la difficulté engendrée par le nombre de facteurs impliqués et le manque de mesures objectives. Le tabagisme passif et la pollution atmosphérique ont été associés avec la sévérité de l'atteinte respiratoire (Rubin 1990; Kovesi et al. 1993; Smyth et al. 1994; Goss et al. 2004). Une prise en charge nutritionnelle optimale a également été associée au pronostic des patients avec une variabilité interindividuelle de réponse au traitement (Shepherd et al. 1980; Dalzell et al. 1992; Kirvela et al. 1993; Steinkamp and von der Hardt 1994; Zemel et al. 2000). Les colonisations des voies aériennes par *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* sont également des facteurs environnementaux associés à un pronostic défavorable avec une durée moyenne de survie diminuée (John et al. 1994; Corey and Farewell 1996; Parad et al. 1999). Un statut socio-économique bas a également été associé à une atteinte respiratoire plus sévère et des taux de mortalité augmentés (Schechter et al. 2001; O'Connor et al. 2003). Ces études montrent que des facteurs environnementaux pourraient être identifiés mais qu'ils ne semblent pas être des facteurs dominants.

A ces observations cliniques s'ajoutent des observations expérimentales montrant des phénotypes variables dans les différents modèles murins d'inactivation du gène *CFTR*. L'ensemble de ces données a permis progressivement de faire émerger l'hypothèse selon laquelle des facteurs autres que les mutations du gène *CFTR*, environnementaux ou génétiques, peuvent rendre compte de l'importante variabilité de l'expression clinique de la maladie. Comme nous l'avons vu ci-dessus, les observations rapportées chez des jumeaux portant la même mutation du gène *CFTR* semblent indiquer que les facteurs environnementaux ne jouent pas un rôle dominant (Mekus et al. 2000). Ces données suggèrent donc fortement l'intervention de variants génétiques, dans le locus de *CFTR*

(facteurs hétéroalléliques) ou en dehors du locus *CFTR*, dans l'expression phénotypique de la maladie et orientent vers la recherche de gènes modificateurs.

3.1.2. Influence de facteurs génétiques modificateurs hétéroalléliques de *CFTR*

Il s'agit de variants du gène *CFTR* situés en des sites différents de la mutation princeps pouvant rendre compte en partie des phénotypes différents chez des patients de même génotype. Dork et al. ont mis en évidence chez un sujet homozygote pour la mutation F508del qui avait une forme moyennement sévère de la maladie, une deuxième mutation R553Q dans une copie du *CFTR* (Dork et al. 1991). Ces auteurs ont émis l'hypothèse que cette dernière mutation permettrait à certains canaux chlorures d'avoir une fonction normale.

L'étude du gène *CFTR* a montré qu'une séquence polymorphe Tn, située dans l'intron 8 proche de l'exon, constituée de 5, 7 ou 9 thymidines (T5, T7, T9) a un rôle important dans le processus d'épissage. Le variant T5 altère l'épissage, l'exon 9 est très souvent absent dans la protéine CFTR, d'où sa diminution quantitative. Ce variant est fréquemment retrouvé chez des sujets présentant une absence bilatérale des canaux déférents, le plus souvent à l'état d'hétérozygote composite. Il peut également aggraver le phénotype lorsqu'il est associé à une mutation délétère comme l'ont décrit l'équipe de Kieswetter (Kiesewetter et al. 1993). Ils ont montré que les sujets hétérozygotes composites *CFTR* mutés/R117H, et en particulier F508del /R117H, peuvent avoir une mucoviscidose avec fonction pancréatique normale, une absence bilatérale des canaux déférents, voire un phénotype normal chez la femme. Chez les sujets ayant une absence bilatérale des canaux déférents ou asymptomatiques, la mutation R117H est associée au variant T7 qui entraîne un épissage normal ; par contre chez les sujets ayant une mucoviscidose la mutation est associée dans la plupart des cas au variant T5. Cette étude démontre que le polymorphisme Tn est un facteur modificateur.

Cuppens et al. ont montré l'influence de 2 autres polymorphismes sur la synthèse de la protéine CFTR (Cuppens et al. 1998). Il s'agit des répétitions TGm, également situées dans l'intron 8, et qui modulent l'épissage de l'exon 9 et du variant M1470V, qui joue un rôle dans la maturation de la protéine. L'effet sur le phénotype de ces polymorphismes est cependant possible mais non démontré. Enfin, chez les patients porteurs de la mutation S549R, la présence du variant -102T>A est associée à des fonctions pancréatiques et respiratoires meilleures comparées aux sujets porteurs du variant -102T>G. Ce variant est localisé dans le promoteur du gène *CFTR* et pourrait stimuler la production de la protéine CFTR à un niveau suffisant pour compenser le défaut moléculaire induit par la mutation S549R (Romey et al. 1999).

Ainsi, la mucoviscidose est caractérisée par une grande hétérogénéité clinique, même chez les patients porteurs de mêmes mutations de *CFTR*. Les études réalisées dans des fratries et chez des jumeaux semblent indiquer que les facteurs environnementaux ne jouent pas un rôle majeur dans cette variabilité phénotypique. Ceci a fait émerger l'hypothèse de l'intervention de gènes dits modificateurs.

3.2. Influence des gènes modificateurs autres que le gène *CFTR*

Le polymorphisme génétique est défini par la présence de variants au niveau de la structure primaire de l'ADN, la présence de l'allèle le plus rare étant retrouvée dans au moins 1% de la population. Chaque individu possède une combinaison unique de traits polymorphiques qui modifie la susceptibilité à développer certaines pathologies ou leurs complications, mais aussi qui module le type de réponse à un médicament ou à une agression. On distingue plusieurs types de polymorphismes, parmi lesquels les marqueurs minisatellites et microsatellites, les délétions ou insertions de courtes séquences nucléotidiques, et les polymorphismes de nucléotide unique (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism). Les SNPs sont très répandus, leur fréquence étant estimée à un polymorphisme nucléotidique toutes les 300 à 1000 pb (Lander et al. 2001). Les polymorphismes nucléotidiques correspondent à une substitution d'une base purique ou pyrimidique par une autre base. Leur localisation dans la partie codante des gènes leur confère généralement une fonctionnalité biologique (polymorphisme fonctionnel) liée à une modification de la transcription, de la stabilité des ARNm ou de la conformation protéique s'il aboutit à la substitution d'un acide aminé. Les polymorphismes situés en dehors des gènes ont des conséquences génétiques moins évidentes et sont généralement utilisés comme marqueur pour des études de liaison génétique.

3.2.1. Polymorphismes et phénotype digestif

Les premiers travaux sur la recherche de gènes modificateurs dans la mucoviscidose ont été menés par une approche de région chromosomique candidate. L'utilisation de modèles murins de mucoviscidose a permis d'identifier un locus impliqué dans la sévérité de l'atteinte digestive. Ce locus, appelé *Cfm1*, a été localisé au niveau de la portion proximale du chromosome 7 chez la souris (synténique de la région 19q13 du génome humain). La région correspondante dans le génome humain a été étudiée dans la mucoviscidose et associée à l'iléus méconial (Zielenski et al. 1999). Mais ces résultats n'ont pu être répliqués dans une plus grande étude, excluant, *a priori*, le rôle de *CFM1* en tant que gène modificateur (Blackman et al. 2006). D'autres travaux ont associé un variant du gène *CLCA1* (chloride channel accessory 1) à la survenue d'iléus méconial dans une cohorte de patients F508del

homozygotes et de génotypes sévères (van der Doef et al. 2010). Enfin, un loci délétère sur le gène *ADIPOR2* (adiponectin receptor 2) et un autre protecteur sur le gène *SLC4A4* ont été mis en évidence et répliqués dans une large étude nord-américaine (Dorfman et al. 2009).

3.2.2. Polymorphismes et phénotype respiratoire

Dans un premier temps, étaient réalisées des études gène-candidat, qui s'intéressaient à des gènes dont les protéines étaient connues pour être impliquées dans la physiopathologie de la maladie. Ainsi, les gènes pouvant moduler la réponse immuno-inflammatoire étant des candidats potentiels, ils ont fait l'objet de nombreuses études. Certaines n'ont pas été répliquées, mais d'autres ont pu montrer que les gènes codant pour le Transforming growth factor beta 1 (*TGFB1*), la mannose binding lectin 2 (*MBL2*), certaines interleukines (*IL*) et les Glutathione-S-transférase (*GST*) en particulier moduleraient la sévérité de l'atteinte respiratoire.

Le *TGFB1* a été associé à la sévérité de diverses pathologies pulmonaires telles que l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive (*BPCO*) (Silverman et al. 2004; Wu et al. 2004). Dans la mucoviscidose, une association entre des variants du gène *TGFB1*, responsables d'une augmentation de l'expression de la protéine, et la sévérité de l'atteinte respiratoire a été retrouvée dans plusieurs cohortes (Arkwright et al. 2003; Drumm et al. 2005; Corvol et al. 2008). Ainsi les allèles situés dans le promoteur -509TT et au niveau du codon 10CC seraient associés à une altération de la fonction pulmonaire. Des études plus récentes suggèrent que ces variants auraient un effet d'autant plus marqué dans des cohortes de patients porteurs de mutations de *CFTR* modérées (Bremer et al. 2008).

La *MBL* est une protéine impliquée dans la réponse immunitaire innée. Un des variants génétiques entraîne l'absence de protéine fonctionnelle et a fait l'objet de nombreuses études. Dans la mucoviscidose, des résultats controversés ont été montrés : certains associent ce variant à une altération prématurée de la fonction pulmonaire (Gabolde et al. 1999; Gabolde et al. 1999; Garred et al. 1999; Davies et al. 2004; Yarden et al. 2004), mais d'autres ne retrouvent pas d'association (Carlsson et al. 2005; Drumm et al. 2005; de Faria et al. 2009). Il en est de même pour son association avec la survenue d'infections à *P. aeruginosa* qui reste controversée (Gabolde et al. 1999; Davies et al. 2004; Yarden et al. 2004; Trevisiol et al. 2005; Dorfman et al. 2008).

Plusieurs gènes codant des interleukines ont été étudiés du fait de leur rôle majeur dans le recrutement des neutrophiles, altéré dans la mucoviscidose. Ainsi, des variants du gène de l'*IL-8* ont été associés à une altération du VEMS (Hillman et al. 2008), alors que ceux de l'*IL-10* ont été associés à la colonisation à *aspergillus fumigatus* (Brouard et al. 2005). Des

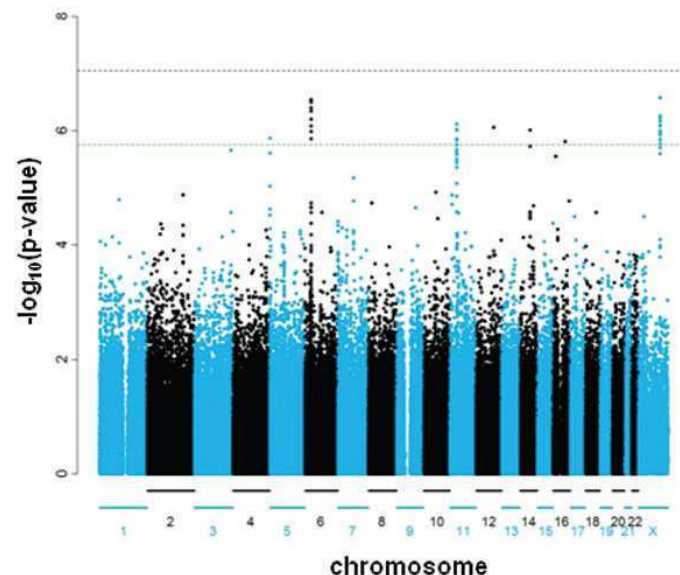
résultats contradictoires ont été observés pour l'*IL1B* (Corvol et al. 2008; Levy et al. 2009). Enfin, certains gènes de la famille des *GST* ont été associés à la variabilité de l'atteinte pulmonaire, en particulier *GSTM1* et 3 (Hull and Thomson 1998; Flamant et al. 2004; Feuillet-Fieux et al. 2009).

Gène	Effet	Références
CFM1	Association controversée ave l'iléus méconial	Zielenski et al. 1999 ; Blackman et al. 2006
CLCA1	Association avec l'iléus méconial	van der Doef et al. 2010
ADIPOR2	Association avec la sévérité digestive dans la mucoviscidose	Dorfman et al 2009
SLC4A4	Association avec la sévérité digestive dans la mucoviscidose	Dorfman et al 2009
TGFB1	Association à une plus grande sévérité pulmonaire	Arkwright et al. 2003; Drumm et al. 2005; Corvol et al. 2008
MBL2	Résultats controversés	Gabolde et al. 1999; Garred et al. 1999; Davies et al. 2004; Yarden et al. 2004 versus Carlsson et al. 2005; Drumm et al. 2005; de Faria et al. 2009
IL-8	Association à la sévérité respiratoire	Hillian et al. 2008
IL-10	Association à la colonisation à <i>A. Fumigatus</i>	Brouard et al. 2005
IL-1B	Résultats controversés	Corvol et al. 2008; Levy et al. 2009
GSTM1-M3	Association à la sévérité pulmonaire	Hull and Thomson 1998; Flamant et al. 2004; Feuillet-Fieux et al. 2009

Tableau 1 [Tableau récapitulatif des principaux gènes modificateurs](#)

Ces travaux « gène-candidat » ont cependant des limites et une nouvelle approche est actuellement utilisée, l'analyse du génome entier (WGA pour whole genome analysis ou GWAS genome-wide association study). Les études de GWAS nécessitent de larges cohortes et leur réplique dans des cohortes indépendantes. Ainsi, une large étude nord-américaine et une étude nationale française sont en cours. Les nord-américains ont publié très récemment les premiers résultats de leur WGA en lien avec l'atteinte respiratoire dans de larges cohortes américaines et canadiennes. Les patients étudiés étaient tous homozygotes pour des mutations sévères. Ils ont identifié 7 régions pour lesquelles une association avec la sévérité de l'atteinte pulmonaire est probable, à proximité des gènes : *APIP/EHF*, *AGTR2*, *HLA-DRA*, *EEA1*, *SLC8A3*, *AHRR* et *CDH8* (Wright et al. 2011). Parmi ces loci, la région *EHF-APIP* en position 11p13 est particulièrement significative. Le gène

APIP code pour une protéine interagissant avec APAF-1 permettant ainsi d'inhiber l'apoptose alors que l'EHF serait un régulateur de la transcription en condition de stress et d'inflammation. De plus, en comparant les patients dans des fratries, des analyses de liaison ont pu mettre en évidence une autre région d'intérêt sur le chromosome 20q13.2, en cours d'exploration.



[Figure 6 Etude de GWAS: identification de 7 régions associée à la sévérité de la fonction pulmonaire \(Wright et al. 2011\)](#)

3.2.3. Polymorphismes et autres symptômes

L'atteinte hépatique dans la mucoviscidose est devenue plus fréquente avec l'augmentation de l'espérance de vie des patients. La lésion hépatique pathognomonique de la mucoviscidose est la cirrhose biliaire focale. A ce jour, il n'a pas été montré d'association entre atteinte hépatique (survenue ou sévérité) et mutations de *CFTR* (Lamireau et al. 2004) mais plusieurs autres loci ont été associés soit à une fréquence accrue d'atteinte hépatique (haplotype *HYPD* de la MBL (Tomaiuolo et al. 2009), gènes codant pour les protéines *ABCB4* (ATP-binding cassette subfamily B member 4) et *GSTP1* (Henrion-Caude et al. 2002)) ; soit à une atteinte plus sévère (allèle Z du gène de l' $\alpha 1$ -antitrypsine) (Bartlett et al. 2009).

Le diabète est une des complications de la mucoviscidose, dont le risque augmente avec l'âge jusqu'à atteindre environ un patient sur 3 à l'âge adulte (Mackie et al. 2003). La survenue d'un diabète est délétère pour la fonction pulmonaire et la mortalité (Mackie et al. 2003). Un gène connu de susceptibilité du diabète de type 2 dans la population générale, le transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*), a également été associé dans la mucoviscidose à un risque accru de diabète (Blackman et al. 2009).

4. Haplotype ancestral AH8.1

Les polymorphismes peuvent être étudiés indépendamment les uns des autres ou être regroupés en haplotype (groupe de gènes situés sur un même chromosome et dont les allèles ségrégent ensemble). Un haplotype ancestral est défini comme un haplotype hautement conservé et qui semble provenir d'un ancêtre commun. L'haplotype AH8.1 se situe au niveau du bras court du chromosome 6p21 dans la région codant le complexe majeur d'histocompatibilité (ou HLA Human Leucocyte Antigen). Il se compose de SNPs situés au niveau du HLA de classe I et II.

Le système HLA contient plus de 200 gènes divisés en 3 classes. Les gènes des classes I et II du HLA codent des glycoprotéines polymorphiques présentes à la surface des cellules, régulant la réponse des cellules T contre des antigènes spécifiques. La classe III contient des protéines qui permettent de moduler la fonction immunitaire.

Parmi les polymorphismes de l'haplotype AH8.1, il faut citer HLA-A1, Cw7, B8, C4A*Q0, C4B*1, DRB1*0301, DRB3*0101, DQA1*0501 et DQB1*0201 (Caruso et al. 2000; Candore et al. 2002), mais aussi les 4 SNPs suivants situés au niveau du CMH de classe III (Figure 7):

- le SNP *LTA* +252 A/G, sur le gène codant pour le LTa (Lymphotoxin a), membre de la famille du TNF, produit par les lymphocytes et impliqué dans la réponse inflammatoire,
- le SNP *TNF* -308 G/A sur le gène codant pour le TNF α (Tumor necrosis factor), cytokine libérée par les leucocytes impliquée dans l'inflammation,
- le SNP *HSPA1B* +1267 A/G codant pour l'HSPA1B (Heat shock protein A1B), protéine participant au repliement des protéines
- le SNP *AGER* -429 T/C codant pour la protéine RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), récepteur de la superfamille des immunoglobulines.

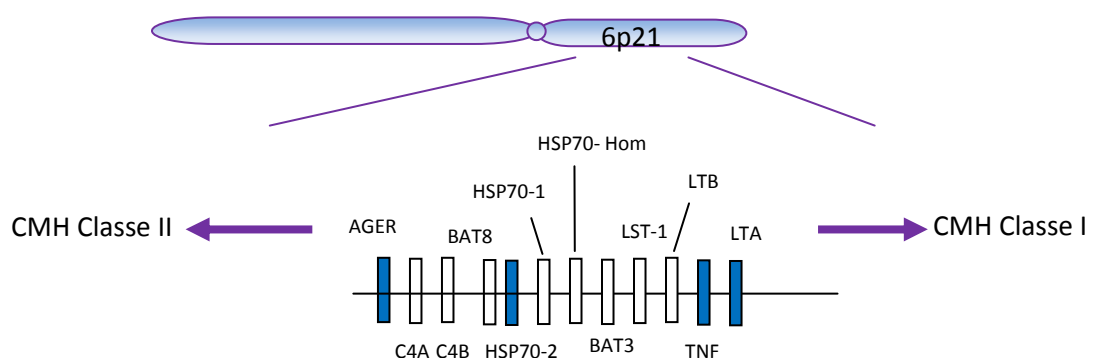


Figure 7 Localisation de l'haplotype ancestral AH8.1 au sein du complexe majeur d'histocompatibilité

Les gènes du CMH de classe III codent des protéines variées sans similitude structurale ou fonctionnelle avec les produits de classe I et II, mais toutes ces protéines sont impliquées dans le système immunitaire.

L'haplotype ancestral AH8.1 est le plus fréquent de la population caucasienne du fait de sa fréquence élevée notamment dans le nord et l'ouest de l'Europe (Candore et al. 2003). Il a été démontré que 88% des australiens d'origine caucasienne porteurs du HLA-B8 avaient tous les autres allèles de l'AH8.1 entre HLA-B et HLA-DR, néanmoins le degré de conservation est inférieur chez les italiens (Degli-Esposti et al. 1992; D'Alfonso et al. 1994). Il a été proposé que les gènes de cet haplotype pourraient modifier la réponse immunitaire et être impliqués dans les réponses immunes et inflammatoires (Yung Yu et al. 2000; Milner and Campbell 2001).

4.1. Heat Shock Protein70-2 (HSP70-2 ou HSPA1B)

4.1.1. Gène et protéine

Hsp70-2 appartient à la famille des Heat Shock Protein (HSP), dont font parties les Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 ou Hsp27 nommées selon leur poids moléculaire. Au sein des Hsp70, on distingue Hsp70-1 (ou HspA1A ou HSP72), Hsp70-2 (ou HspA1B) et Hsp-hom (ou HspA1L). Hsc (Heat shock cognate) 70 est un homologue de Hsp70, exprimé de façon constitutive. Le gène codant pour Hsp70-2 est situé sur le chromosome 6p21, et code pour une protéine dont la forme native est composée de 641 acides aminés, d'un poids moléculaire de 70 kDa. Les HspA1A et HspA1B sont toutes deux composées d'un unique exon et ont une grande homologie de séquence, ne différant qu'au niveau de 6 bases. A proximité se situe le gène HspA1L, orienté en sens inverse des 2 précédents (Figure 8).

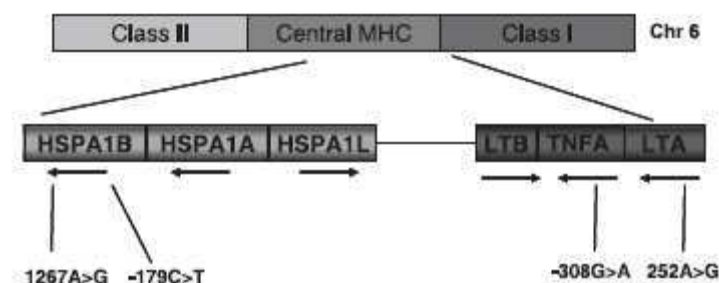


Figure 8 Localisation des gènes HSP sur le chromosome 6p21 (D'après (Kee et al. 2008))

HspA1B est une protéine ubiquitaire, nucléaire et cytoplasmique. Les Hsp ont été découvertes par hasard en 1962 par F. Ritosa lors de l'étude de glandes salivaires de mouche *Drosophila*. Elles ont été identifiées comme des protéines hautement conservées, dont l'expression est augmentée en cas d'élévation de la température. Très rapidement il a été montré que leur synthèse est augmentée non seulement par la chaleur mais également par le stress (Prohaszka and Fust 2004), les métaux lourds, les drogues cytostatiques, les inhibiteurs de COX, l'acide acétylsalicylique, le stress oxydant ou les radiations. Les protéines Hsp70 ont 2 domaines : un domaine N-terminal de 45 kDa qui contient un site ATPase qui lie l'ATP et hydrolyse l'ADP. L'échange de l'ATP réalise des changements conformationnels dans le second domaine. Le domaine C-terminal est divisé en un sous-domaine β qui permet la fixation du substrat et une extrémité C-terminale hélicoïdale qui agit comme un « couvercle » pour le domaine de fixation du substrat.

4.1.2. Production, régulation

Le mécanisme de libération des Hsp dans le milieu extracellulaire n'a pas été clairement élucidé, il pourrait au final y avoir 2 origines de Hsp extracellulaire : active et passive. Il est évoqué que les Hsp soient libérées passivement par lyse cellulaire au cours de la nécrose (Basu et al. 2000). De plus, plusieurs mécanismes de libération active ont été évoqués : à partir d'un exosome (vésicule d'export initialement dérivée de la membrane plasmique, par endocytose) (De Maio; Bausero et al. 2005), par l'intermédiaire de transporteurs de type ATP-binding cassette (ABC) (Mambula and Calderwood 2006), ou encore par l'insertion de la protéine dans des vésicules (Vega et al. 2008). Des études *in vitro* ont montré que l'IL-6 pourrait augmenter la production de HSP par l'intermédiaire d'un signal de transduction ou STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) (Stephanou et al. 1998). De même, le TNF- α (Nakano et al. 1996) ou l'interféron- γ (IFN- γ), par l'intermédiaire de STAT-1 (Stephanou and Latchman 1999), peuvent activer HSP. Ces molécules pourraient avoir un effet pro- ou anti-inflammatoire selon leur composition (O'Neill and Quah 2008; Chalmin et al. 2010).

L'activité chaperonne de ces molécules est contrôlée par le site de liaison à l'ATP, qui entraîne une modification de conformation de la protéine. Quand une protéine Hsp70 est liée à l'ATP, le « couvercle » est ouvert et relâche le peptide. Lorsque les protéines Hsp70 sont liées à l'ADP, le couvercle est fermé, et les peptides sont étroitement liés au domaine de fixation du substrat (Palleros et al. 1994).

Les Hsp ont été identifiées dans la circulation d'individus sains (Pockley et al. 1998; Dhingra et al. 2006) et leurs taux augmentent après un effort intense (Febbraio et al. 2002; Fehrenbach et al. 2005).

4.1.3. Fonctions

En fonction de leur localisation intra- ou extra-cellulaire, les Hsp ont des fonctions différentes : molécules chaperonnes ou molécules de l'immunité. En conditions normales, les Hsp sont des molécules chaperonnes, qui se lient à des polypeptides hydrophobes, médiant ainsi le repliement des protéines. Elles ont un rôle protecteur en guidant la dégradation de protéines mal repliées ou partiellement dénaturées et en permettant la stabilisation et la protection de protéines nouvellement synthétisées. Selon que la conformation de la protéine est bonne ou mauvaise, elle permettra ou non l'association de la Hsp ou sera dirigée vers le protéasome pour être dégradée.

Ainsi, en présence de la mutation *CFTR* F508del par exemple, il existe un défaut de repliement de la protéine dans le réticulum endoplasmique. La protéine interagit alors avec des protéines chaperonnes, dont Hsp70, et est ubiquitinée avant d'être dégradée dans le protéasome (Figure 9) (Kopito 1999). Ce mécanisme est dépendant de l'ATP.

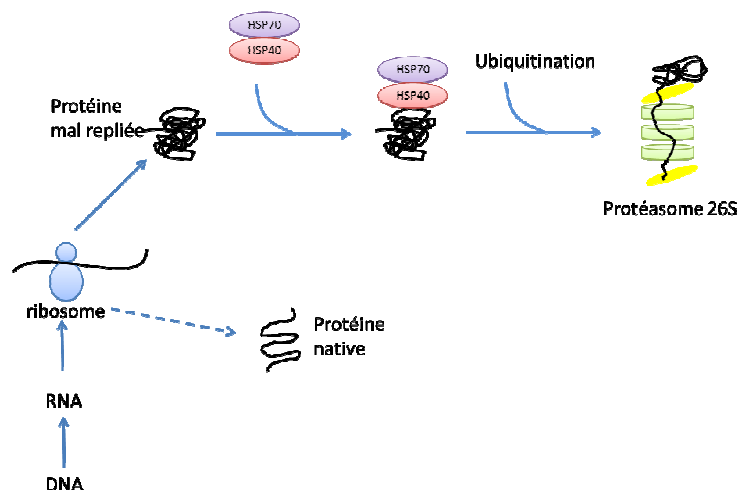


Figure 9 Rôle de molécule chaperonne des HSP

Les protéines Hsp sont impliquées dans la transduction du signal, la régulation du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose. L'apoptose est une mort cellulaire programmée, activée par l'intermédiaire des caspases, elles-mêmes régulées par voie cellulaire intrinsèque ou extrinsèque. Dans la voie intrinsèque, il existe une libération par les

mitochondries de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol permettant le recrutement de caspases. Dans la voie extrinsèque, le recrutement des caspases se fait par l'intermédiaire de liaisons entre des ligands et des récepteurs de mort situés à la surface de la cellule (récepteur au TNF ou récepteur Fas). Les Hsp70 ont un rôle antiapoptotique en agissant à différents niveaux : inhibition des caspases-3, 8 ou 9, de JNK, et de Apaf-1 (Beere 2004; Arya et al. 2007). Hsp70 inhibe la formation d'un complexe apoptotique fonctionnel. Hsp70 peut également inhiber l'activation de NF- κ B (Ran et al. 2004), en inhibant la phosphorylation de I κ B α induite par le TNF- α . Il aurait alors un rôle proapoptotique qui permettrait d'établir une balance entre pro- et anti-apoptose. Le phénomène qui fait que les HSPs puissent avoir un rôle anti- ou pro-inflammatoire selon les conditions a été décrit comme le «heat shock paradoxe» (Chen et al. 2007). Par leur fonction antiapoptotique, les Hsp protègent les cellules de la cytotoxicité induite par les monocytes, le TNF, le stress oxydatif ou la chaleur (Jaattela et al. 1992; Jaattela and Wissing 1993; Van Molle et al. 2002). Il n'est pas étonnant que ces protéines, impliquées dans le cycle cellulaire, le soient également dans des processus pathologiques tels que l'oncogenèse, le vieillissement, les pathologies neurodégénératives et dysimmunitaires.

Les Hsp ont un rôle important dans l'immunité : présentation des antigènes, activation des lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques (Li et al. 2002). Il a été suggéré que ces molécules seraient un lien entre l'immunité innée et acquise (Srivastava 2002). Il a été montré que les cellules nécrotiques et apoptotiques libèrent des motifs moléculaires tels que HMGB1, les Hsp ou les protéines S-100, qui favorisent les réponses immunitaires innées et acquises (Srikrishna and Freeze 2009). Les Hsp, libérées dans le milieu extracellulaire, ont un rôle pro-inflammatoire en activant les monocytes, favorisant la libération de cytokines, telles que l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF- α (Asea et al. 2000; Giacconi et al. 2005) et en activant le complément (Prohaszka et al. 2002). Elles peuvent également activer des signaux de transduction par l'intermédiaire des toll like receptor (TLR2 et TLR4) conduisant à l'activation de NF- κ B et des mitogen-activated protein (MAP) kinases (Asea et al. 2000; Asea et al. 2002).

La présence des Hsp70 dans le sérum est associée à des conditions de stress telles que l'inflammation, les infections virales ou bactériennes ou le cancer.

4.1.4. HSP et pathologies pulmonaires

Les vésicules contenant Hsp ont pu être purifiées notamment du liquide bronchoalvéolaire (Admyre et al. 2003) et peuvent induire le recrutement de polynucléaires dans les poumons après une instillation nasale de macrophages infectés (Bhatnagar et al. 2007).

Des taux plus faibles de Hsp70 ont été observés dans la **bronchopneumopathie chronique obstructive** (BPCO) par rapport à des contrôles et sont corrélés au VEMS (Xie et al. 2010). Ainsi, la diminution de Hsp pourrait augmenter la sensibilité au calcium et augmenter la contractilité des muscles lisses.

Au contraire, dans **l'asthme**, les taux de Hsp, augmentés dans le plasma et dans les ECBC sont associés au niveau d'obstruction des voies aériennes (Vignola et al. 1995; Changchun et al. 2011). Les taux sont corrélés à ceux des neutrophiles dans le plasma et les voies aériennes.

HspA1A est un marqueur de stress dans **l'atteinte pulmonaire aiguë** (Ganter et al. 2006). Dans un modèle animal d'atteinte pulmonaire aiguë aux décours d'une pancréatite aiguë, le traitement par sérum salé hypertonique diminuerait les lésions du tissu pulmonaire et modulerait l'expression de protéines impliquées dans l'inflammation (Moretti et al. 2009). Le sérum salé hypertonique permettrait de maintenir une expression élevée de Hsp70 et de réduire partiellement l'expression de MMP-9 et ainsi diminuer l'infiltration pulmonaire par les neutrophiles.

Dans la **mucoviscidose**, comme nous l'avons vu précédemment, la mutation F508del entraîne une anomalie de repliement de la protéine CFTR, qui est retenue dans le réticulum endoplasmique et rapidement dégradée. Comme d'autres protéines, le repliement de CFTR est dépendant de molécules chaperonnes telles que les Hsp70 (Meacham et al. 2001). Les sites d'interaction entre HSP70 et CFTR se situent principalement au niveau de la région NBD1 (Meacham et al. 1999) et la mutation F508del augmente l'affinité pour les protéines Hsp70 (Scott-Ward and Amaral 2009).

4.1.5. Polymorphismes du HSP

Un polymorphisme consistant en une modification d'une adénine en une guanine au niveau du nucléotide +1267 de la protéine Hsp70-2 (ou HspA1B +1267A/G), résulte en une modification silencieuse de la région codante. D'après Hapmap, la fréquence de la répartition des 3 génotypes dans la population caucasienne est de 10,5% pour le génotype GG, 36,8% pour AG et 52,6% pour AA. La présence de l'allèle G a été décrite comme un facteur de risque dans de nombreuses pathologies, telles que la pancréatite, la maladie de Crohn, des pathologies vasculaires (Balog et al. 2005; Giacconi et al. 2005; Klausz et al. 2005; Giacconi et al. 2006) et des cancers (Shibata et al. 2009; Sfar et al. 2010). Il a également été associé à une sensibilité différentielle à certains médicaments (Martin et al. 2004). Enfin, l'allèle mineur a été impliqué dans une plus longue longévité (Singh et al. 2010).

L'allèle mineur +1267G a été associé à un taux accru de production de la protéine HSP chez des patients ayant une insuffisance cardiaque sévère (Giacconi et al. 2005; Gombos et al. 2008). Une étude chez des patients ayant présenté une pneumonie communautaire a montré que la présence du polymorphisme +1267A était associée à un risque plus élevé de développer un choc septique (Waterer et al. 2003).

D'un point de vue fonctionnel, l'impact de ce polymorphisme sur les taux d'ARN messager reste controversé (Pociot et al. 1993; Schroeder et al. 2000; Temple et al. 2004; Giacconi et al. 2005; Kee et al. 2008). Le polymorphisme HspA1B +1267A/G n'a pas pu être associé au taux d'ARNm d'HspA1B (Temple et al. 2004).

4.2. Tumor Necrosis Factor α (TNF α)

4.2.1. Gène et protéine

Le TNF- α appartient à la superfamille du TNF, qui comprend au moins 20 molécules de nature peptidique, dont les plus connues sont la lymphotoxine α (LTA), le TNF- α , le Fas ligand (FasL), le receptor-activator of NF- κ B ligand (RANKL), le TNF-related-apoptosis-inducing ligand (TRAIL) et le CD40 ligand (CD40L).

Le gène codant pour le TNF- α est situé sur le chromosome 6p21 chez l'homme, et code pour une protéine dont la forme native est composée de 233 acides aminés, d'un poids moléculaire de 26 kDa.

4.2.2. Production, régulation

Cette glycoprotéine est principalement obtenue par clivage d'un précurseur se trouvant à la surface des monocytes et des macrophages tissulaires. Elle est également produite par de nombreux autres types cellulaires du système immunitaire (lymphocytes B et T, cellules NK, cellules dendritiques, polynucléaires basophiles, éosinophiles et neutrophiles, mastocytes), mais aussi par les fibroblastes, kératinocytes, cellules musculaires lisses, neurones, astrocytes, cellules gliales ou des cellules tumorales. La forme nouvellement synthétisée est exprimée à la surface de la membrane cellulaire, puis clivée au niveau d'un domaine extracellulaire par des métalloprotéases, dont la TNF- α -converting enzyme (TACE). La forme membranaire du TNF- α est biologiquement active, responsable d'effets cytotoxiques ou inflammatoires à la suite de contacts intercellulaires. Le clivage par TACE libère un polypeptide secondairement oligomérisé pour former un homotrimère qui constitue la forme sécrétée. On dénombre donc deux formes de TNF- α : une soluble et une liée à la membrane, toutes deux actives mais avec des affinités différentes pour les récepteurs au TNF (TNF receptor superfamily (TNFR)-I et TNFR-II) (Vandenabeele et al. 1995).

La synthèse du TNF- α est régulée de manière stricte, de telle sorte que l'expression du gène du *TNF* est très faible en absence de stimulation. Par contre, le TNF- α est produit en grande quantité et précocement par des macrophages activés. Sa libération est stimulée par plusieurs autres médiateurs, comme l'IL-1 mais aussi l'IL-6, l'IL-12 ou l'IFN- γ . En effet, on estime que la quantité de transcrits augmente rapidement dans les 15 à 30 minutes qui suivent la stimulation, sans qu'une synthèse protéique *de novo* ne soit nécessaire. Il existe également une régulation post-transcriptionnelle du TNF- α , qui réside en partie dans la présence, dans la région 3' de l'ARNm, de séquences répétées adénosine-uridine (AU), qui rendent le messager instable et empêchent ainsi sa traduction, celui-ci étant rapidement dégradé par les RNAses cytoplasmiques. Sa production est inhibée par le TGF- β , l'IL6, l'IL10, les corticoïdes, la cyclosporine A et la prostaglandine E2.

Les récepteurs sont présents sur tous les types cellulaires, l'expression du TNF-RI est constitutive, alors que celle du TNF-RII est inductible (Vandenabeele et al. 1995). Le TNF- α membranaire se lie préférentiellement au récepteur TNF-RI, alors que la forme soluble a plus d'affinité pour le TNF-RII. La fixation aux différents récepteurs conduit à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire, conduisant à l'activation de réponses inflammatoires aiguës ou chroniques, à la différenciation, la prolifération cellulaire ou l'apoptose (Barnes and Karin 1997; Karin et al. 1997). La partie extracellulaire de ces deux récepteurs peut être clivée en récepteurs solubles qui se comportent comme des inhibiteurs naturels (Beutler and Cerami 1989). Dans les états inflammatoires aigus et chroniques, il existe une augmentation importante des taux sériques des 2 types de récepteurs, qui sont ensuite éliminés dans les urines. Le TNF- α se lie rapidement avec une forte affinité aux 2 récepteurs, mais la dissociation est rapide pour TNF-RII, alors que la liaison au TNF-RI semble quasiment irréversible. Le domaine intracellulaire du TNF-RI comporte des homologies avec le domaine intracellulaire de Fas. Cette séquence joue un rôle central dans l'induction du signal apoptotique par le TNF- α , en permettant le recrutement de molécules adaptatrices.

4.2.3. Fonctions

Le TNF- α a été décrit en 1975 par Carswell *et al.* sous la forme d'un facteur libéré par les cellules de l'hôte, induisant une nécrose tumorale *in vivo* et capable d'effets pro-apoptotiques sur des cellules tumorales mais aussi sur des cellules saines (lymphocytes T, cellules épithéliales) (Carswell et al. 1975). L'exposition au TNF- α entraîne l'activation de la cascade des caspases responsable de l'apoptose (Chang and Yang 2000). Il module la prolifération et la différenciation de nombreux types cellulaires. Il peut induire une cachexie en stimulant

la lipolyse adipocytaire, la lipogenèse hépatique et en supprimant la sensation de faim au niveau de l'hypothalamus.

La liaison du TNF- α à son récepteur peut simultanément initier différentes voies qui favorisent ou inhibent l'apoptose, ce qui suppose l'existence de mécanismes intracellulaires qui orientent la réponse dans un sens plutôt qu'un autre. La sélection de la réponse dominante (pro- ou anti-apoptotique) semble dépendre avant tout des concentrations relatives des intermédiaires intracellulaires (Vandenabeele et al. 1995).

Le TNF- α est un inducteur de la réponse inflammatoire en phase aiguë et un élément essentiel de la régulation de l'immunité innée. Il attire efficacement les polynucléaires neutrophiles pour leur permettre de sortir de l'endothélium par diapédèse. Le TNF- α , par son action sur les neutrophiles, participe à l'inflammation dans la mucoviscidose caractérisée par l'excès de polynucléaires neutrophiles. Il induit la synthèse d'un certain nombre de facteurs chimiotactiques permettant le ciblage tissulaire d'effecteurs cellulaires. Dans les voies aériennes, le TNF- α induit la libération de cytokines IL6 et IL8 et augmente la production de mucus. Il s'agit d'un facteur proangiogénique et procoagulant *in vivo*.

4.2.4. TNF et pathologies pulmonaires

Au niveau pulmonaire, le TNF- α active les molécules d'adhésion conduisant à la migration des éosinophiles et des neutrophiles dans les voies aériennes.

Ainsi, il joue un rôle majeur dans l'initiation et l'amplification de l'inflammation bronchique dans **l'asthme**. Il est stocké dans les mastocytes et rapidement libéré lors de la réaction IgE-dépendante. Il conduit à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B ou Activator Protein (AP)-1 (Kips et al. 1993). Des taux augmentés de TNF- α ont été observés dans des ECBC et des LBA de patients asthmatiques (Gosset et al. 1991; Bradding et al. 1994). Les patients avec un asthme réfractaire ont une sur-régulation de l'axe TNF- α (Howarth et al. 2005; Berry et al. 2006).

Le TNF- α semble également jouer un rôle clé dans la **BPCO**, où il a été associé dans des modèles animaux à des caractéristiques pathologiques telles que l'infiltration pulmonaire par des cellules inflammatoires, la fibrose pulmonaire ou l'emphysème (Matera et al. 2010). *In vivo*, des taux élevés de TNF- α ont été retrouvés dans le sang, des biopsies bronchiques, des ECBC ou des LBA par rapport à des contrôles (Matera et al. 2010), bien que des résultats contradictoires aient été obtenus (Moermans et al. 2011).

Il existe également une augmentation de la sécrétion de TNF- α par les macrophages alvéolaires des malades atteints de **sarcoïdose** résistante aux corticoïdes (Ziegenhagen et al. 2002).

Dans la **mucoviscidose**, des taux élevés de TNF- α ont été retrouvés dans les voies respiratoires (expectorations, LBA) des patients (Bonfield et al. 1995). De plus, la fonction pulmonaire est négativement corrélée aux concentrations de TNF- α dans les ECBC de patients atteints de mucoviscidose (Grealley et al. 1993; Colombo et al. 2005). Les taux de TNF- α diminuent en cours de traitement d'une exacerbation et sont corrélés à la C-reactive protéine (CRP), marqueur de l'inflammation (Colombo et al. 2011). Le TNF- α pourrait également avoir un rôle dans la réparation tissulaire. Deux effets paradoxaux ont été démontrés, d'un côté une diminution de la croissance cellulaire, d'un autre une augmentation de la migration de cellules bronchiques augmentant ainsi la vitesse de cicatrisation (Maille et al. 2011).

4.2.5. Polymorphismes du TNF- α

Plusieurs polymorphismes ont été décrits pour ce gène, dont 3 dans la région du promoteur (-851C/T, -308G/A, -238G/A), et un localisé dans le premier intron +691G *ins/del* (*insertion/délétion*). Le SNP situé en position -308 dans la région promotrice du TNF- α affecte une séquence consensus pour le site de fixation du facteur transcriptionnel AP-1. D'après Hapmap, la fréquence de la répartition des 3 génotypes du polymorphisme *TNF*-308G/A dans la population caucasienne est de 67,2% pour le génotype GG, 31% pour AG et 1,8% pour AA. Les polymorphismes en position -238, -308 et -857 du gène du *TNF- α* pourraient influencer le taux de production du TNF (Stuber et al. 1996; Kroeger et al. 1997; Kaluza et al. 2000). Une revue récente s'est intéressée aux études fonctionnelles réalisées sur les polymorphismes du promoteur du *TNF* et plus particulièrement du *TNF* -308G/A chez des sujets **sains** (Mekinian et al. 2011). D'après leur étude, aucune association n'a été trouvée entre ce polymorphisme et les taux d'ARNm ou de protéine. Dans leur méta-analyse, ils ont trouvé 45 études parmi lesquelles 21 remplissaient les critères d'inclusion. Comme le génotype -308AA est rare, les génotypes porteurs de l'allèle mineur A (AA ou AG, également appelé *TNF*-2) ont été regroupés. Aucune différence n'a été retrouvée entre les taux protéiques des 2 groupes, ni entre les taux circulants de TNF- α . Le nombre d'études était insuffisant pour évaluer l'ARNm. Dans des conditions pathologiques, les résultats sont discordants.

Ces polymorphismes ont fait l'objet de plusieurs études dans **l'asthme** et la **BPCO** (Stankovic et al. 2009; Tsai et al. 2011; Zhang et al. 2011). Chez des sujets adultes, il a été

rapporté une fréquence accrue de l'allèle -308A chez les patients développant un tableau de BPCO (Huang et al. 1997; Wilson et al. 1997). Par contre, le polymorphisme du TNF -308G/A n'a pas été associé au déclin de la fonction respiratoire dans la BPCO (Sandford et al. 2001).

Dans la **mucoviscidose**, la majorité des travaux a porté sur le polymorphisme *TNF* -308A/G. Une association négative a été rapportée entre l'allèle *TNF*-308A et le statut clinique (Hull and Thomson 1998). Ultérieurement, aucune équipe n'a retrouvé d'association entre ce polymorphisme *TNF*-308 et les taux plasmatiques de TNF- α ou la fonction pulmonaire (Arkwright et al. 2003; Drumm et al. 2005; Schmitt-Grohe et al. 2006; Corvol et al. 2008). Yarden et al. ont étudié 4 polymorphismes du *TNF* dans une population de 180 enfants atteints de mucoviscidose F508del homozygotes (Yarden et al. 2005). Ils n'observent pas d'association entre les génotypes *TNF*-308 G/A ou -238 G/A et avec la fonction respiratoire ou l'âge de la première infection à *P. aeruginosa*. Cependant, les patients hétérozygotes pour le locus *TNF*+691G ins/del ont tendance à avoir une meilleure fonction pulmonaire et un âge plus tardif de première infection à *P. aeruginosa* que les patients homozygotes pour *TNF*+691Gins. Ils rapportent également une plus grande proportion de patients homozygotes pour le locus *TNF*-851C dans le groupe de patients ayant un VEMS inférieur à 70% des valeurs attendues.

Buranawuti *et al.* retrouvent une fréquence accrue du polymorphisme *TNF* -238G/A chez des adultes par rapport à des enfants atteints par la mucoviscidose (Buranawuti et al. 2007). De plus, le génotype *TNF* -238G/A est absent chez des patients décédés de la mucoviscidose par rapport à des adultes porteurs de la même pathologie. Ainsi, l'allèle *TNF*-238A pourrait améliorer la survie en modifiant la sévérité de la maladie (Stanke et al. 2006).

4.3. Lymphotoxine alpha (LTA)

4.3.1. Gène et protéine

La lymphotoxine A, ou TNF- β , et la lymphotoxine B (LTB) appartiennent à la superfamille du TNF. Le gène codant pour la lymphotoxine A, situé sur le chromosome 6p21, à proximité de celui du TNF- α , est composé de 4 exons et 3 introns. Il code pour une protéine dont la forme native est composée de 205 acides aminés, d'un poids moléculaire de 65 kDa.

4.3.2. Production, régulation

La protéine LTA est produite par les lymphocytes T activés, les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales. Les activités biologiques du LTA sont identiques à celles du TNF- α , ce qui explique que leurs fonctions soient comparables. La lymphotoxine alpha (LTa)

existe sous forme d'un homotrimère (LT α 3) ou d'un hétérotrimère transmembranaire (LT α 2 β 1 ou Lymphotoxine B). La lymphotoxine A produite sous forme d'un homotrimère, qui caractérise tous les membres de la famille du TNF, joue un rôle crucial dans le développement et l'architecture des organes lymphoïdes (Janeway C 1999).

Les deux récepteurs sont capables de fixer le TNF- α et la lymphotoxine A, mais chaque liaison ligand-récepteur a un rôle différent, limitant les redondances au niveau immunitaire.

4.3.3. Fonctions

La lymphotoxine A est une cytokine pro-inflammatoire et pro-apoptotique, qui joue un rôle dans la réponse immunitaire en activant et en recrutant des cellules effectrices sur le site de l'inflammation, facilitant l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales. Elle a été impliquée dans la destruction tissulaire au cours de multiples pathologies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde ou la sclérose multiple (Selmaj et al. 1991; Grom et al. 1996).

Les lymphotoxines A et B sont des cytokines importantes impliquées dans le développement des organes lymphoïdes (Demoor et al. 2009). La lymphangiogenèse survient sur les sites de l'inflammation, notamment au cours de transplantation ou d'infection pulmonaire (Baluk et al. 2005; Maruyama et al. 2005). Lors de situation d'inflammation chronique comme les pathologies auto-immunes ou les infections, il se produit une accumulation de cellules lymphoïdes qui ressemble à des ganglions lymphatiques. Ce phénomène nécessite l'intervention de lymphotoxine (Drayton et al. 2006).

Des souris déficientes en LT-alpha (LTA $-/-$) ont un phénotype caractérisé par un défaut de développement des organes lymphoïdes secondaires. Les souris LTA $-/-$ n'ont pas de ganglions lymphatiques et ont des anomalies structurales de la rate. Cette absence de ganglions lymphatiques entraîne une accumulation de lymphocytes dans les régions péri-vasculaires du poumon et du foie (Banks et al. 1995).

4.3.4. LTA et pathologies pulmonaires

En cas d'inflammation, la LTA intervient sur le flux dans les canaux lymphatiques et la lymphangiogenèse (Mounzer et al. 2010).

4.3.5. Polymorphismes du LTA

Le polymorphisme LTA+252A/G se situe au niveau du nucléotide 1064 sur un site de restriction NcoI dans le premier intron. D'après Hapmap, la fréquence de la répartition des 3 génotypes dans la population caucasienne est de 8,3% pour le génotype GG, 55% pour AG et 36,7% pour AA.

Ce polymorphisme a été impliqué dans la modulation d'expression de gènes et associé à des taux de production de TNF- α plus élevés (Messer et al. 1991; Pociot et al. 1991; Stuber et al. 1996; Wilson et al. 1997; Ozaki et al. 2002). Il a été associé à une sécrétion accrue de TNF- α au cours du sepsis et *in vitro* en réponse au LPS (Holmes et al. 2003).

Il a également été rapporté comme un gène modificateur de susceptibilité dans **l'asthme** ou **l'infarctus** du myocarde (Moffatt and Cookson 1997; Ozaki et al. 2002). Aucune association n'a pu être retrouvée entre ce polymorphisme et la réponse aux bronchodilatateurs ou la rapidité d'évolution de l'obstruction chez des patients atteints d'une BPCO (Sandford et al. 2001; Tanaka et al. 2007).

Dans la **mucoviscidose**, le polymorphisme +869T/C a été associé à un déclin accru de la fonction pulmonaire. Les patients hétérozygotes CT ont un déclin moins important du VEMS et de la capacité vitale forcée, un autre paramètre mesuré aux EFR (Corvol et al. 2008).

4.4. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)

4.4.1. Gène et protéine

Le gène nommé *AGER* est situé sur le chromosome 6p21, et code la protéine RAGE dont la forme native est composée de 404 acides aminés, d'un poids moléculaire de 35 kDa dans sa forme soluble (Neeper et al. 1992). Il s'agit d'un récepteur transmembranaire de la super famille des immunoglobulines (Neeper et al. 1992). Il comprend 11 exons entrecoupés de 10 introns.

4.4.2. Production, régulation

Il a été initialement découvert grâce à sa capacité à reconnaître des produits glycosylés : AGEs (Advanced glycation end products). Ces derniers sont les produits formés par la glycosylation non-enzymatique et l'oxydation de protéines, de lipides et autres macromolécules, dans des conditions particulières d'excès de sucres réducteurs et/ou de stress oxydatif (Schlueter et al. 2003). La forme membranaire (mRAGE ou full-length fl-RAGE) est exprimée au niveau de plusieurs types cellulaires et plus particulièrement dans les pneumocytes de type I matures (Shirasawa et al. 2004), mais également au niveau des monocytes, macrophages, cellules musculaires lisses, cellules mésangiales, cellules nerveuses et fibroblastes. Les cellules épithéliales alvéolaires (ou pneumocytes) ont plusieurs fonctions importantes : maintien de la barrière étanche, régulation de la production de surfactant, élimination de l'excès de liquide alvéolaire par transport ionique, régulation de

l'inflammation locale et la coagulation (Matthay et al. 2005). Les pneumocytes de type I recouvrent 95% de la surface de l'épithélium alvéolaire.

Le récepteur membranaire fl-RAGE comporte 5 domaines (Figure 10) : le domaine cytosolique, situé en C-terminal, qui est responsable de la transduction du signal, le domaine transmembranaire qui permet l'ancrage à la membrane, et une partie extracellulaire contenant le domaine V (ou variable) qui lie les ligands de RAGE et 2 domaines C (ou constant).

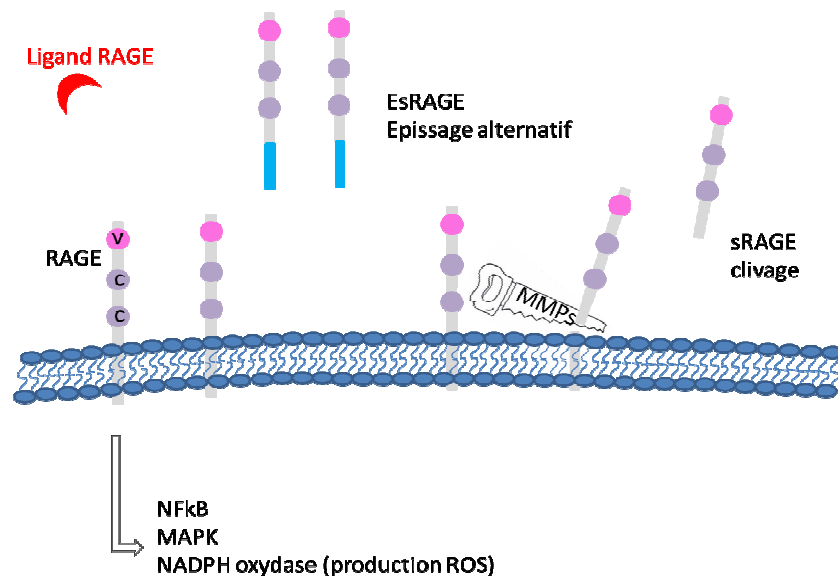


Figure 10 Représentation schématique du récepteur RAGE (D'après (Vazzana et al. 2009))

Le domaine V, situé en N-terminal, contient 2 sites de N-glycosylation et est responsable de la majorité des liaisons avec les ligands (Srikrishna et al. 2002). Ces 3 domaines (V, C1, C2) interagissent et se lient aux ligands de RAGE, que sont : les AGE (Advanced Glycation Endproducts) (Neeper et al. 1992), HMGB1(High Mobility Group Box 1) (Hori et al. 1995), les calgranulines (ou S100) (Hofmann et al. 1999) et les amyloïde beta peptide ou beta fibrille (Yan et al. 1996). L'augmentation de l'expression de RAGE à la surface cellulaire est reliée à une accumulation de ses ligands (Bopp et al. 2008).

La région extracellulaire peut être présente sous forme soluble dans différents organes et dans le plasma : formes s-RAGE (Soluble RAGE) ou es-RAGE (Endogenous secretory-RAGE). Ces 2 formes ont un rôle de récepteur leurre, qui antagonisent fl-RAGE en se liant aux ligands sans qu'il n'y ait de transduction du signal étant donné qu'il n'y a pas de domaine intracellulaire (Raucci et al. 2008).

La forme es-RAGE est produite par épissage alternatif de l'ARN au niveau de l'exon 9 et contient une extrémité C-terminal différente (Yonekura et al. 2003). Alors que fl-RAGE est prédominant dans le poumon et les cellules musculaires lisses de l'aorte ; esRAGE est prédominant dans les cellules endothéliales.

Le domaine extracellulaire peut être sécrété sous la forme soluble s-RAGE après clivage par des métalloprotéases (MMP). Cette forme comprend donc les domaines V et C mais ne possède ni les domaines transmembranaires ni intracellulaires. En conséquence, s-RAGE se retrouve dans le milieu extracellulaire. Les métalloprotéases susceptibles de cliver RAGE sont les MMP-3, MMP-9, MMP-13 et, ADAM10 (Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10) (Raucci et al. 2008; Zhang et al. 2008; Yamakawa et al. 2011). Les MMP-3 et MMP-13 colocalisent avec le récepteur RAGE dans des cellules épithéliales alvéolaires en culture et les taux de RAGE sont corrélés à ceux des MMP-3 et MMP-13 (Yamakawa et al. 2011). Jackson et al ont démontré un profil spécifique des MMPs-8, -9, -11 et -12 en période d'exacerbation dans la mucoviscidose (Jackson et al. 2010). Notamment l'activité de la MMP-9 est augmentée dans ces conditions (Gaggar et al. 2007). Il a été démontré que la collagénase MMP-8 est augmentée dans le LBA de patients atteints de mucoviscidose (Ratjen et al. 2002). De même, les activités de la MMP-9 et de l'élastase HNE (human neutrophil elastase) sont également augmentées et les TIMPs sont diminués dans la mucoviscidose en dehors d'exacerbation (Ratjen et al. 2002; Hilliard et al. 2007; Jackson et al. 2010) et sont corrélés à la fonction pulmonaire. Ces données suggèrent une dérégulation de la voie protéolytique dans la mucoviscidose, susceptible de déréguler la sécrétion de sRAGE. Les taux sériques de MMP-8 et MMP-9 sont également augmentés dans la mucoviscidose, faisant de ces protéines de bons marqueurs d'exacerbation (Roderfeld et al. 2009).

4.4.3. Fonctions

RAGE joue un rôle pro-inflammatoire, après activation de voies de signalisation intracellulaire telles que les MAP kinases ou NF- κ B ([Figure 11](#)). L'activation de ces voies de signalisation varie en fonction des ligands de RAGE (Taguchi et al. 2000; Reddy et al. 2006; Leclerc et al. 2007). Il ne semble pas exister un schéma d'activation exclusif à un type cellulaire. La voie activée serait plutôt fonction du caractère aiguë ou chronique du signal (Ramasamy et al. 2009). RAGE active la synthèse *de novo* de NF- κ B-p65, permettant ainsi de maintenir une quantité constante de ce facteur de transcription pro-inflammatoire (Bierhaus et al. 2001).

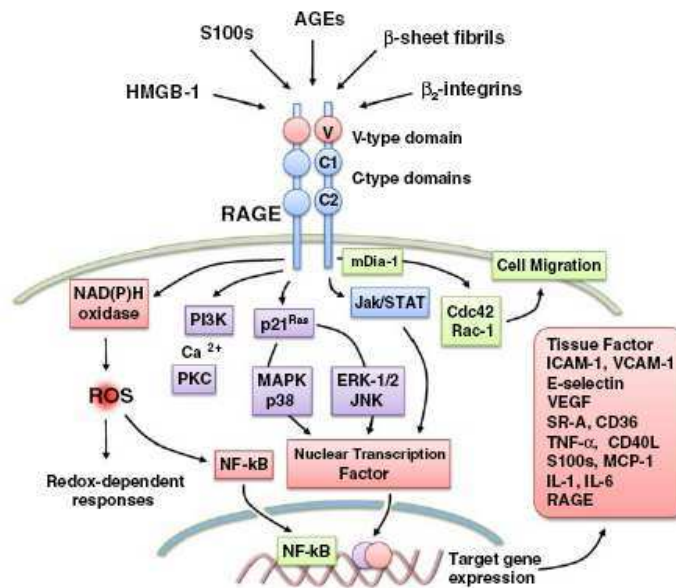


Figure 11 Voies de signalisation de RAGE (D'après (Vazzana et al. 2009))

De façon physiologique, RAGE joue un rôle dans l'expansion et la croissance cellulaire (Brett et al. 1993), le vieillissement (Oimomi et al. 1986). La présence de RAGE à un niveau basal élevé dans le poumon sain suggère qu'il a un rôle important dans l'homéostasie pulmonaire, qui reste mal connu. Il a été suggéré chez le rat que l'augmentation progressive des taux de RAGE, observée dès la vie fœtale, pourrait correspondre à l'alvéolarisation et à l'expansion des pneumocytes I (Lizotte et al. 2007). RAGE favorise l'adhérence des cellules épithéliales au collagène et induit la croissance cellulaire (Demling et al. 2006). RAGE peut ainsi permettre aux pneumocytes I de croître et d'acquérir leur morphologie, pour assurer ensuite les échanges gazeux et la stabilité des alvéoles (Demling et al. 2006). En dehors de toute pathologie, les taux de RAGE chez des nourrissons de moins de 8 mois sont plus élevés que ceux de leur mère (Boor et al. 2010). Chez les souris, celles qui n'expriment pas RAGE au niveau pulmonaire, présentent un phénotype fibrotique à l'âge adulte (Kasper M 2003). A long terme, l'absence de RAGE peut causer une perte de l'homéostasie alvéolaire (Bartling et al. 2005) et entraîner un remodelage de l'épithélium alvéolaire.

4.4.4. RAGE et pathologies pulmonaires

Plusieurs études ont démontré que RAGE était impliquée dans différentes pathologies inflammatoires telles que :

- Des pathologies neurologiques, notamment la maladie d'Alzheimer
- Des pathologies cardio-vasculaires
- Des pathologies métaboliques, notamment le diabète

- Des pathologies pulmonaires

- Des cancers

Concernant les formes solubles de RAGE, elles semblent pouvoir avoir un rôle pro-inflammatoire ou au contraire anti-inflammatoire de récepteur antagoniste en fonction des situations. Ainsi, le taux de RAGE soluble dans le sérum est significativement abaissé chez des patients non-diabétiques ayant une pathologie coronarienne par rapport à ceux n'en ayant pas (Hofmann et al. 1999). Au contraire, une étude a montré que des taux de sRAGE augmentés et de es-RAGE diminués sont associés à une défaillance cardiaque tant chez les diabétiques que chez les non diabétiques (Wang et al. 2011). De même, sRAGE est plus élevé chez des patients présentant un choc septique par rapport à des volontaires sains et les taux les plus élevés sont prédictifs du risque de décès (Bopp et al. 2008).

Deux études du génome entier ont montré que le locus du gène *AGER* agit comme un déterminant important de la fonction pulmonaire en dehors de toutes pathologies (Hancock et al. 2010; Repapi et al. 2010). RAGE est utilisé en tant que marqueur sélectif des cellules alvéolaires de type I (ou pneumocytes I) pour étudier les lésions ou réparations pulmonaires (McElroy and Kasper 2004; Shirasawa et al. 2004). Ainsi, il a été démontré son intérêt en tant que marqueur de gravité dans le **syndrome de détresse respiratoire aiguë** (SDRA) (Calfee et al. 2008; Mauri et al. 2010; Nakamura et al. 2011). Les taux de RAGE plasmatiques chez des patients présentant un SDRA sont significativement supérieurs à ceux retrouvés chez des témoins (Uchida et al. 2006). Des taux élevés de RAGE étaient associés à un taux de mortalité plus élevé et une plus longue période de ventilation mécanique et de défaillance multiviscérale (Calfee et al. 2008).

Le taux plasmatique est également corrélé au risque à court terme de rejet de greffon après une **greffe pulmonaire**. Ainsi, des taux élevés peu de temps après la reperfusion d'un greffon sont associés à un mauvais devenir à court terme (Calfee et al. 2007). De même, des taux plasmatiques de sRAGE élevés, sont associés à un plus grand risque de dysfonction du greffon mais également à plus de besoin transfusionnel et plus de recours à la circulation extracorporelle dans les suites à court terme d'une transplantation pulmonaire (Christie et al. 2009). Une augmentation des taux de RAGE a également pu être observée dans le LBA et dans des biopsies transbronchiques réalisées après transplantation chez des patients présentant une dysfonction du transplant (Pelaiez et al. 2010).

RAGE semble jouer un rôle important dans la **fibrose pulmonaire** (Hanford et al. 2003; Queisser et al. 2008). Dans des modèles animaux, les taux de RAGE membranaire et sRAGE sont tous les 2 abaissés après un traitement par la bléomycine ou une asbestose (Hanford et al. 2003; Englert et al. 2008). Ces résultats ont été retrouvés chez l'homme, où

les taux de RAGE dans des biopsies pulmonaires ou des LBA de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique sont abaissées par rapport à des témoins (Englert et al. 2008; Queisser et al. 2008). RAGE est également retrouvé abaissé dans les **cancers** pulmonaires (Schraml et al. 1997; Bartling et al. 2005).

Dans les **BPCO**, les études retrouvent une diminution des taux de sRAGE et ce d'autant plus dans les formes sévères, sans modification des taux de esRAGE (Ohlmeier et al. 2010). Ils émettent l'hypothèse que RAGE serait un marqueur de dommage tissulaire mais pas d'emphysème. Des taux de sRAGE abaissés ont été corrélés à un degré plus important d'obstruction pulmonaire (évalué par le VEMS) (Smith et al. 2011). De même, Miniati et al. retrouvent des taux de sRAGE abaissés chez des patients atteints d'une BPCO par rapport à des sujets sans obstruction bronchique (Miniati et al. 2011), mais ils y trouvent également une association avec l'emphysème contrairement à Ohlmeier et al.

Dans l'**asthme**, les taux de esRAGE ont été étudiés dans les ECBC et sont augmentés par rapport aux contrôles, suggérant la présence d'un phénomène de régulation pour limiter l'activation de RAGE (Watanabe et al. 2010).

Dans la **mucoviscidose**, il a été montré que l'expression de RAGE était augmentée dans les neutrophiles des voies aériennes de patients atteints de mucoviscidose par rapport aux taux sanguins (Makam et al. 2009). De plus, la forme soluble sRAGE n'était pas détectable dans les liquides pulmonaires, alors qu'elle est présente en grande quantité dans le plasma.

4.4.5. Polymorphismes de *AGER*

Des polymorphismes de *AGER* situés au niveau du promoteur et dans des exons ont été étudiés du fait de leurs répercussions éventuelles sur l'expression et la fonctionnalité de la protéine. Le polymorphisme *AGER*-429T/C (rs1800625) a fait l'objet de plusieurs études, sa fréquence de répartition dans la population caucasienne est de 71,7% pour le génotype TT, 25,7% pour CT et 2,7% pour CC. Des études se sont attachées à rechercher une relation entre ces polymorphismes et les taux sériques de RAGE. Les résultats sont discordants : il a été montré une association entre les variants *AGER*-429T/C et les taux sériques de esRAGE et sRAGE (Kalousova et al. 2007; Peng et al. 2009). Mais l'étude de Gaens *et al.* ont analysé 8 autres polymorphismes de *AGER* et n'ont trouvé aucune association entre les taux sériques de sRAGE et les SNPs suivants : rs204995, rs1800624, rs1800625, rs1035798, rs184003, rs3134943, rs9469089, rs3134945 (Gaens et al. 2009). Le variant G82S (Gly82Ser, rs2070600) est localisé au niveau de la région codante pour le domaine V. Chez le nourrisson, il a été montré que les individus porteur d'au moins un allèle T pour le variant G82S ont des taux diminués de sRAGE par rapport aux CC, cette différence persiste à l'âge adulte (Gaens et al. 2009; Boor et al. 2010). Une étude de GWAS dans une large population

d'individus sains a montré que ce même G82S était corrélé à la fonction pulmonaire (Hancock et al. 2010; Repapi et al. 2010). Le polymorphisme -374T/C (rs1800624), situé dans le promoteur pourrait exercer une influence sur la transcription du gène *AGER* (Hudson et al. 2001). De plus, des études de fonctionnalité avec le polymorphisme -429T/C, rapportent une augmentation de l'activité du promoteur en présence de l'allèle mineur C (Hudson et al. 2001).

Au total, les localisations, fonctions et implications dans la mucoviscidose des 4 gènes peuvent être résumées ainsi (Figure 12):

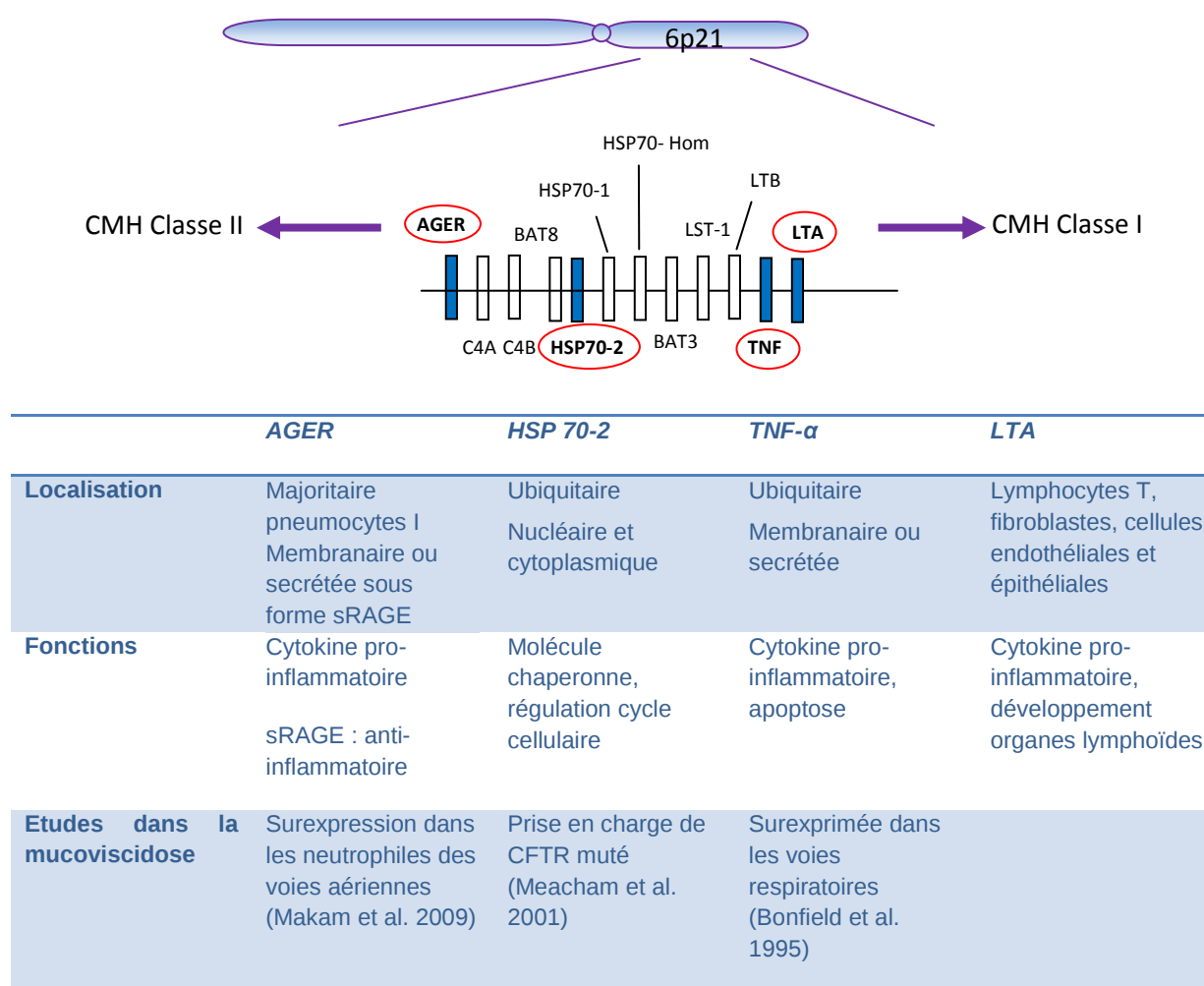


Figure 12 Récapitulatif des 4 gènes étudiés composant l'haplotype AH8.1

4.5. Implications cliniques de l'haplotype AH8.1

Cet haplotype AH8.1 est associé à un grand nombre de désordres du système immunitaire, y compris chez des sujets sains en altérant la balance des cytokines. Il jouerait un rôle dans un grand nombre de pathologies auto- immunes (Candore et al. 2007).

Les mécanismes mis en jeu en présence de cet haplotype AH8.1 ont fait l'objet d'études et des perturbations du système immunitaire ont été rapportées.

Parmi les individus porteurs de l'haplotype, 70% ont un allèle C4 nul, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas de protéine C4 fonctionnelle (Candore et al. 2003). La protéine C4 est une protéine impliquée dans la voie classique du complément et est importante pour la clairance des complexes immuns. Ces perturbations pourraient favoriser la production d'auto-anticorps (Price et al. 1999; Candore et al. 2003) et la survenue de pathologies auto-immunes.

Cet haplotype est également associé à des anomalies du profil biologique des immunoglobulines (Ig). Les immunoglobulines G neutralisent les toxines et les microbes, contribuent à l'opsonisation et activent la cascade du complément par la voie classique. Le taux d'immunoglobuline de classe G et de sous-classe 2 (IgG2) est significativement plus bas chez les individus porteurs de l'haplotype AH8.1, aucune différence n'a été retrouvée pour les autres classes IgA, E et M ; ni pour les autres sous-classes IgG1, 3 et 4 dans le sérum (Candore et al. 2007). Les IgG2 sont indispensables pour lutter contre les germes encapsulés, tels que l'*Haemophilus Influenzae B* ou le *pneumocoque*.

Chez des sujets sains, cet haplotype a également été associé à une diminution de la réponse humorale de type 1 (Caruso et al. 1996; Caruso et al. 2000; Candore et al. 2002). La réponse humorale de type 1 est médiée par les cytokines de type 1 : interféron- γ (IFN- γ), IL-2, IL-12, TNF- α et la réponse humorale de type 2 est médiée par les cytokines : IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (Figure 13). Plus précisément, la capacité des lymphocytes à produire IL-2, IL-5, IL-12 et IFN- γ serait altérée chez des sujets sains porteurs de l'haplotype AH8.1 après stimulation. Aucune différence n'est observée pour la production des cytokines IL-4, IL-6, IL-10 et IL-13 ; alors que la production de TNF- α serait augmentée (Candore et al. 2002).

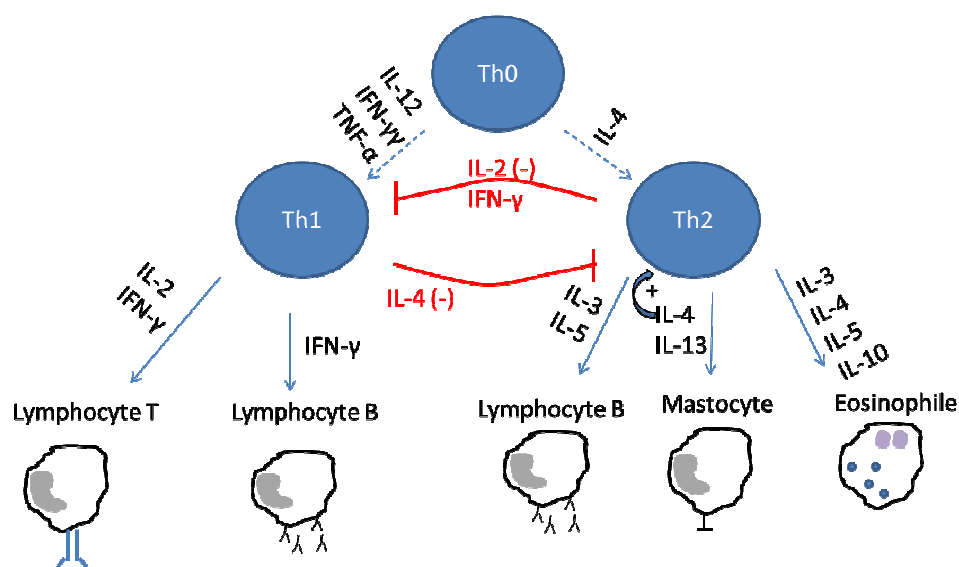


Figure 13 Différenciation des lymphocytes Th0 en cellules Th1 et Th2 et régulation

L'équipe de Candore conclut à un déséquilibre de la balance avec une diminution de la réponse Th1 et au contraire une augmentation de la réponse humorale de type 2 ; même si la production de l'IL-5 est diminuée et celle du TNF- α augmentée. Ce déséquilibre serait responsable d'une diminution du chimiotactisme chez ces individus (Candore et al. 2006).

Au total, les individus porteurs de l'haplotype ancestral AH8.1 auraient une perturbation de la réponse immunitaire (Tableau 2) :

Anomalies immunologiques observées	Effets de l'haplotype AH8.1
Production d'auto-anticorps	Augmentée
Activation des lymphocytes T	Augmentée
Complexes immuns circulants	Augmentés
Taux sanguins de lymphocytes	Diminué, augmentation de l'apoptose de lymphocytes
Activité des cellules NK	Diminuée
Chimiotactisme des neutrophils	Diminué

Production de cytokines Th1	Diminuée
Production de cytokines Th2	Augmentée

Tableau 2 Anomalies immunologiques observées en présence de l'haplotype ancestral AH8.1

Cet haplotype a été associé à une augmentation de l'espérance de vie (Caruso et al. 2000), ce qui peut sembler surprenant étant donné les déséquilibres immunitaires qu'il entraîne. Il est hautement conservé dans la population européenne, suggérant un effet bénéfique compensatoire dans le passé. Il a en effet été évoqué que cet haplotype permettrait une meilleure résistance aux infections, même s'il a été associé à une progression plus rapide de la maladie chez les sujets séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) porteur de l'haplotype AH8.1 (Cameron et al. 1990).

4.6. Implications de l'haplotype AH8.1 dans la mucoviscidose

Dans la mucoviscidose, une étude portant sur 72 enfants atteints de mucoviscidose, trois des polymorphismes de cet haplotype (*TNF* -308 G/A, *HSPA1L* +1267 A/G, *RAGE* -429 T/C) ont été associés à un retard de primo-colonisation à *P. aeruginosa* et à *Staphylococcus aureus* (Laki et al. 2006).

5. Ligands de RAGE

5.1. High mobility group box 1 (HMGB1)

5.1.1. Gène et protéine

Membre de la superfamille des protéines HMG (High mobility group), la protéine HMGB1 (High mobility group box 1) appelée auparavant HMG-1 ou «amphotérine» est ubiquitaire chez les eucaryotes et absente chez les eubactéries et les archaebactéries. Son gène se situe sur le chromosome 13q12 et code pour une protéine nucléaire, de nature «non-histone», de poids moléculaire de 30 kDa et composée de 116 acides aminés dont la séquence est hautement conservée chez les mammifères. Ce sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolution, avec une homologie de séquence de plus de 98% entre les humains et les rongeurs (Wang et al., 2004). HMGB1 possède deux motifs structuraux caractéristiques, les boîtes A et B, interagissant avec l'ADN ([Figure 14](#)) et une queue terminale acide qui, à l'état de repos, interagit avec les boîtes A et B permettant à HMGB1 de

se lier d'abord à l'ADN avant d'interagir avec d'autres facteurs (NF- κ B, p53,...) (Knapp et al. 2004).

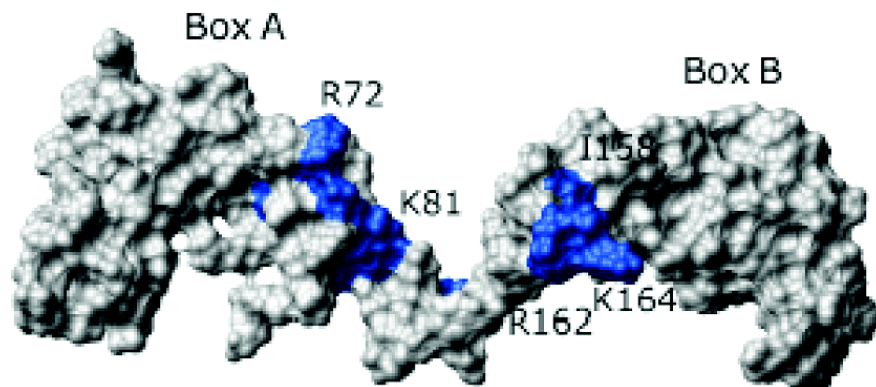


Figure 14 Représentation schématique de HMGB1 (d'après (Knapp et al. 2004))

HMGB1 a aussi été identifiée comme une protéine membranaire dans certains types cellulaires sous l'appellation d'amphotérine (ses deux extrémités sont de charges opposées). On distingue 3 sous-classes de protéines HMG : HMGA, HMGB et HMGN ; mais seul HMGB1 a été identifié comme pouvant activer RAGE. Les protéines HMGB ont une longue queue en C-terminal, composée de résidus aspartiques et glutamiques. HMGB1 a la capacité de se déplacer dans le cytosol par translocation.

5.1.2. Production, régulation

HMGB1 subit d'importantes modifications post traductionnelles, qui affectent sa capacité à migrer du noyau au cytosol. HMGB1 est sécrété par les macrophages, les cellules NK (natural killer) ou les cellules dendritiques matures après stimulation par des cytokines proinflammatoires telles que le TNF- α , ou l'IL1- β (Wang et al. 1999). La sécrétion de HMGB1 peut également être induite par le stress oxydant. Cette protéine peut également être libérée de façon passive par nécrose cellulaire, où la mort de la cellule est associée à une perméabilisation précoce des membranes cellulaires. Les formes libérées de façon passive ont le même rôle pro-inflammatoire que les formes libérées activement (Scaffidi et al. 2002; Bonaldi et al. 2003). Par contre, les cellules apoptotiques, dont l'intégrité membranaire est conservée, retiennent les protéines HMGB1 sur leur chromatine. Cette protéine peut également se lier, en plus du récepteur RAGE, aux récepteurs toll like recepteur (TLR)-2, TLR-4 et TLR-9 (Yu et al. 2006; Ivanov et al. 2007). L'activation des récepteurs conduit à l'expression de NF- κ B, de molécules d'adhésion et de cytokines (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12).

HMGB1 entretient l'inflammation par l'intermédiaire d'une boucle de rétrocontrôle positive puisque NF- κ B augmente l'expression de divers récepteurs dont RAGE et TLR2.

5.1.3. HMGB1 et fonctions

En conditions normales, la protéine HMGB1 joue un rôle de facteur de transcription ([Figure 15](#)). Elle se lie à l'ADN double brin et facilite de nombreuses fonctions nucléaires incluant la stabilisation du nucléosome, la transcription, la réplication et la recombinaison (Bustin 1999). Elle a également un rôle important dans le remodelage de la chromatine. L'interaction des protéines HMGB avec l'ADN joue un rôle comparable à celui de l'histone H1, protéine qui se fixe entre les nucléosomes et qui contrôle en partie le niveau de condensation de l'ADN. Comme RAGE, HMGB1 a un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaires. La forme soluble de HMGB1 agit comme une puissante cytokine pro-inflammatoire d'apparition plus tardive que le TNF ou l'IL-1 (Wang et al. 2004). HMGB1 peut également induire l'expression de molécules d'adhésion (VCAM, ICAM), du récepteur RAGE, et de diverses cytokines (TNF, IL-8 ou MCP-1) (Fiuza et al. 2003), ce qui étend ses activités biologiques à la régulation de la coagulation.

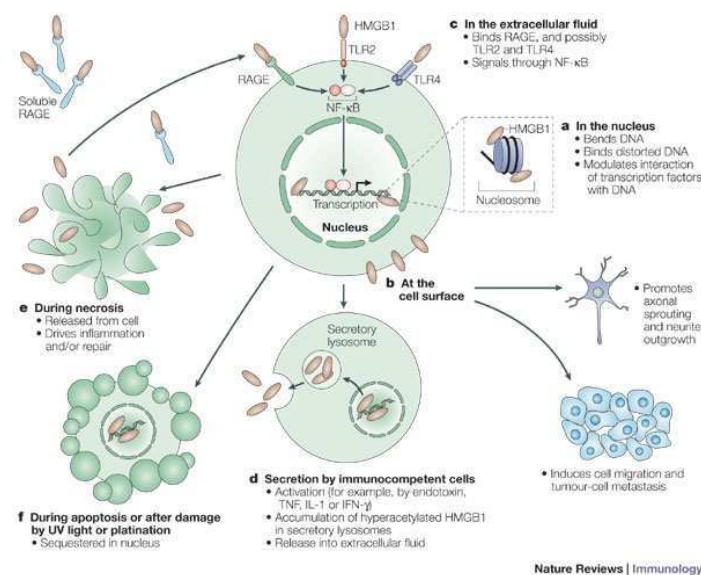


Figure 15 Rôles intra- et extracellulaires de la protéine HMGB1 (D'après Lotze et Tracey, 2005)

5.1.4. HMGB1 et pathologies

L'activité cytokinique de HMGB1 est liée à un domaine de 20 acides aminés présent dans la boîte B de la protéine HMGB1 humaine (Andersson et al. 2002). HMGB1 agit comme médiateur dans la réponse immunitaire et comme facteur d'activation des monocytes/macrophages (Dumitriu et al. 2005).

De plus en plus d'études associent HMGB1 à des **désordres inflammatoires** et **septiques** (Andersson et al. 2002; Wang et al. 2004; Yamada and Maruyama 2007). Cette protéine a été mise en évidence sous forme soluble dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Kokkola et al. 2002; Kokkola et al. 2003; Taniguchi et al. 2003). Elle agit comme facteur pathogénique dans l'athérosclérose (Kalinina et al. 2004), la polymyosite ainsi que dans la dermatomyosite (Ulfgren et al. 2004). Le rôle de HMGB1 dans l'entretien de processus inflammatoires associés aux septicémies a également été décrit (Wang et al. 2004) ; ainsi que son rôle de médiateur dans le cancer (Shang et al. 2009).

HMGB1 a également été étudié dans diverses pathologies pulmonaires. Dans le **SDRA**, HMGB1 a été associée à l'accumulation de neutrophiles, l'apparition d'un œdème pulmonaire et la libération de cytokines (Abraham et al. 2000; Ueno et al. 2004). De plus, toujours dans cette pathologie, les taux sériques de HMGB1 et de sRAGE seraient corrélés (Nakamura et al. 2011). Dans l'**asthme** et les **BPCO**, les concentrations d'HMGB1 dans le plasma et les ECBC sont significativement plus élevées par rapport à des témoins (Watanabe et al. 2010). De plus, ces taux sont corrélés au degré d'obstruction des voies aériennes évalué par le VEMS. Il en est de même pour la mucoviscidose, où des taux augmentés d'HMGB1 ont été observés (Rowe et al. 2008). HMGB1 aurait un rôle important dans l'afflux des neutrophiles dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose, de part ses propriétés chémoattractrices (Rowe et al. 2008).

5.2. Calgranuline (S100)

5.2.1. Gène et protéine

Les protéines S100 sont des petites protéines acides dont le poids moléculaire varie entre 10 et 12 kDa. Avec 25 membres plus ou moins décrits chez l'homme, les protéines S100 constituent la plus grande sous-famille de protéines avec un domaine EF hand (structure hélice-boucle-hélice- [Figure 16](#)). Elles sont caractérisées par 2 domaines liant le calcium reliés par une région charnière centrale H. Deux boucles à calcium, L1 et L2, sont entourées chacune de deux hélices alpha (Donato 2001). Ces deux protéines lient les molécules de calcium avec des affinités différentes. Certaines protéines S100 peuvent aussi lier une molécule de zinc avec une forte affinité (Donato 1999). Les gènes codant pour la sous-classe S100a se situent sur le chromosome 1q21. Leur dénomination vient de leur parfaite solubilité dans une solution à 100 % de saturation en sulfate d'ammonium.

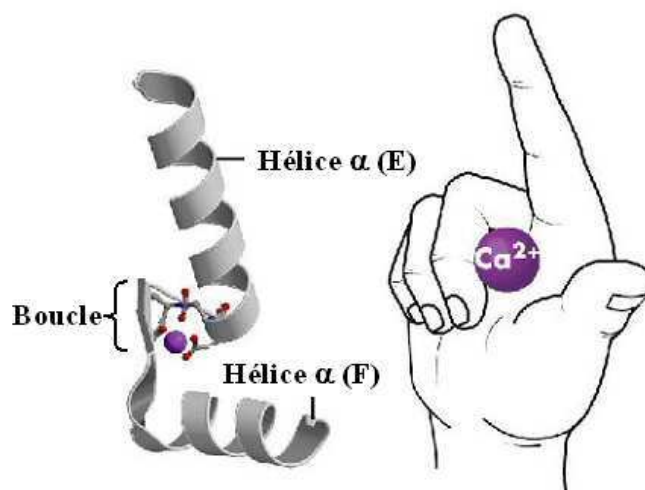


Figure 16 Représentation schématique du motif en main EF. D'après <http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/EF-Hand.jpg>.

Les membres de cette famille diffèrent entre eux selon la longueur et la séquence de leur région centrale et selon leur extrémité C-terminale. La liaison au calcium induit un changement conformationnel qui expose un domaine de liaison hydrophobe et permet de se lier à des protéines cibles. Les S100A sont exprimées dans différents types cellulaires, dont les neutrophiles, macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques. Les protéines S100 sont sous forme d'homo- et / ou d'hétérodimères où les monomères sont liés de façon anti-parallèles par des interactions non covalentes. Les principales calgranulines étudiées dans les pathologies pulmonaires sont les S100A8, S100A9 et S100A12. Les protéines S100A8 (MRP8), S100A9 (MRP14) forment un hétérodimère, également nommé calprotectine. Les calgranulines S100A8/S100A9 et S100A12 ne sont retrouvées que dans les neutrophiles et monocytes (Kerkhoff et al. 1998). Seuls certains membres de cette famille peuvent se lier au récepteur RAGE.

5.2.2. Production, régulation

Elles interviendraient aux niveaux intra- et extracellulaires dans la régulation de divers processus tels que la transcription, la phosphorylation de protéines, la prolifération, la motilité, la survie, la différenciation cellulaire, ainsi que la régulation du cycle cellulaire. Le dimère S100A8/S100A9 régule la migration et l'adhésion des leucocytes (Ryckman et al. 2003).

Un blocage de l'interaction entre RAGE et les calgranulines est responsable d'une diminution de l'activation de NF- κ B et de la production de cytokines.

5.2.3. S100A et pathologies

Les S100 ont un rôle dans différentes pathologies inflammatoires non infectieuses, plus spécialement l'hétérodimère S100A8/S100A9 ou l'homodimère S100A12, qui se lient au récepteur RAGE. Elles s'accumulent sur le site d'inflammation chronique dans des pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, l'arthrite juvénile idiopathique, les maladies auto-immunes systémiques, le psoriasis ou les maladies inflammatoires chroniques intestinales.

Au niveau pulmonaire, le ligand S100A12 est augmenté dans les tissus pulmonaires et les LBA de patients présentant un **SDRA** (Wittkowski et al. 2007). L'hétérodimère S100A8/S100A9 pourrait maintenir l'inflammation chronique et le remodelage des voies aériennes dans l'**asthme** (Halayko and Ghavami 2009).

L'étude de Foell et al. a montré que S100A12 est exprimé par les neutrophiles pulmonaires dans la **mucoviscidose**. Les taux de S100A12 dans des ECBC de patients atteints de mucoviscidose sont extrêmement plus élevés que ceux de témoins (Foell et al. 2003; Makam et al. 2009). De plus, dans la mucoviscidose, les taux de S100A12 sont 100 fois plus élevés dans les liquides pulmonaires que dans le plasma (Makam et al. 2009).

OBJECTIFS DE TRAVAIL

La mucoviscidose est caractérisée par une importante variabilité phénotypique entre les patients, même pour des patients porteurs de mêmes mutations *CFTR*. L'haplotype ancestral AH8.1 est impliqué dans la réponse immuno-inflammatoire. Dans la mucoviscidose, trois des polymorphismes de cet haplotype (*TNF* -308 G/A, *HSPA1B* +1267 A/G, *RAGE* -429 T/C) ont été associés, dans une petite cohorte, à un retard de primo-colonisation des voies aériennes à *P. aeruginosa* et à *Staphylococcus aureus* (Laki et al. 2006).

L'objectif de ce travail était tout d'abord de déterminer si la variabilité du phénotype respiratoire dans la mucoviscidose pouvait en partie être associée à l'haplotype ancestral AH8.1. Dans un second temps, nos objectifs étaient d'étudier les conséquences biologiques de chacun des variants constituant l'haplotype. En effet, ces 4 polymorphismes sont situés dans des gènes codants pour des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire. Ils pourraient ainsi, individuellement ou en combinaison, modifier l'évolution de l'atteinte respiratoire dans la mucoviscidose.

Nous avons suivis 2 axes : le génotypage des patients puis des études de fonctionnalité des variants. Nous avons réalisé une première analyse génétique pilote dans une cohorte européenne de patients atteints de la mucoviscidose. Nous avons ensuite répliqué nos résultats sur une plus large cohorte française. Enfin, nous avons testé des associations haplotype/phénotype puis génotype/phénotype.

L'identification d'une association entre des variants génétiques et le phénotype n'indiquant pas nécessairement l'existence d'une relation de cause à effet, ces études ont été complétées par des analyses biologiques et des études de fonctionnalité. Le but était de caractériser au niveau cellulaire et moléculaire les conséquences biologiques des polymorphismes composant l'haplotype AH8.1. Chacun de ces polymorphismes étant situé dans différentes parties du gène (promoteur, intron ou exon), les méthodes utilisées ont varié en fonction des répercussions possibles.

MATERIEL ET METHODES

1. Populations d'étude

Pour l'ensemble des sujets étudiés, un consentement éclairé du sujet ou des parents a été recueilli. Le projet a obtenu les autorisations des autorités compétentes nécessaires.

La population de patients atteints de mucoviscidose comporte 3 groupes :

1) un groupe de 404 européens atteints de mucoviscidose inclus en France (n=230), en Allemagne (n=95) et en Grande Bretagne (n=79). Ces patients ont des génotypes de *CFTR* variables.

2) Un groupe de patients issus des patients inclus dans le projet national de recherche des gènes modificateurs de la mucoviscidose (coordinateur : H. Corvol). L'ensemble des 49 CRCM Français participe actuellement à ce projet et plus de 3600 patients ont été inclus. Nous disposons pour chaque patient de données cliniques longitudinales et d'un prélèvement d'ADN stockés au Généthon (Evry).

Parmi les patients inclus dans le projet national, nous avons sélectionné

- un groupe de 1039 patients homozygotes pour la mutation F508del, d'origine européenne de père et de mère, et ayant eu des mesures de la fonction respiratoire pendant au moins 3 ans (>8 ans).
- un groupe de 145 patients non homozygotes pour la mutation F508del mais ayant 2 mutations « sévères » de *CFTR* associées à une insuffisance pancréatique exocrine (mutations de classe I, II ou III)

Pour l'ensemble de ces patients, nous avons extrait de la base phénotypique les données cliniques d'intérêt pour ce projet, à savoir :

- Date de naissance, sexe
- Mutations de *CFTR*
- Statut pancréatique
- Explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) avec en particulier mesure des volumes pulmonaires (volume expiré maximal par seconde : VEMS), des débits expiratoires et des échanges gazeux.
- Evolutivité du poids, de la taille, et de l'index de masse corporelle (IMC z-score).

3) Un groupe de 72 enfants atteints de mucoviscidose suivis au CRCM pédiatrique de l'hôpital Trousseau. Ces patients ont eu un prélèvement sanguin, réalisé au cours d'un bilan systématique, à l'état stable afin de réaliser des dosages protéiques plasmatiques. Pour ces

enfants, porteurs de diverses mutations de *CFTR*, des données phénotypiques supplémentaires ont été recueillies :

- L'âge d'infection ou de colonisation par le *S. aureus* ou le *P. aeruginosa*
- La présence d'un diabète
- Les taux sanguins d'immunoglobulines G, A et M et la C-reactive protein (CRP) le jour de la consultation
- La pression artérielle en oxygène (PaO₂) en mmHg lors de gaz du sang artérialisé le jour de la consultation

La population témoin est composée de 32 sujets adultes sans antécédents particuliers pour lesquels nous disposons d'extraits d'ADN et de plasma.

2. Méthodes de génotypage

Le génotypage a été réalisé en utilisant une technique automatique de discrimination allélique basée sur la technique de PCR en temps réel. Le génotypage des SNP *LTA* +252A/G (rs909253), *TNF* -308G/A (rs1800629), *HSPA1B* +1267A/G (rs1061581) et *AGER* -429T/C (rs1800625) a été réalisé par PCR à partir d'ADN de patients ou d'ADN issus de culture cellulaire. Deux sondes fluorescentes appelées VIC et FAM, spécifiques de chaque allèle du polymorphisme étudié sont ajoutées au milieu réactionnel de PCR ([Figure 17](#)). La PCR a été réalisée avec une sonde TaqMan® MGB probes, FAM™ and VIC® dye-labeled (Applied Biosystems, US). Le mix de PCR est préparé en utilisant du TaqMan® universal PCR Master Mix NO AmpErase UNG (2X) (Applied Biosystems, US), du Assay Mix, de l'eau et une sonde ; pour un total de 15µl par puits. La réaction de PCR est réalisée sur un Step-One-Plus real time PCR (Applied Biosystems, US) suivie d'une lecture en point final de la fluorescence ([Figure 18](#)).

3. Dosages plasmatiques

3.1. Soluble RAGE

La protéine sRAGE est dosée par ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*) dans le plasma, après recueil de sang total et centrifugation 5 min à 3000 g. Un kit commercial Duoset (R&D systems, UK) a été utilisé et nous avons suivi les recommandations du fabricant.

Les puits de plaques de microtitration sont sensibilisés avec 100 µl d'anticorps monoclonaux de souris anti-sRAGE et incubés une nuit à température ambiante. Après lavages avec un tampon PBS-Tween (0,05%), les plaques sont saturées pendant 1 h à température ambiante avec 300 µl/puits de Reagent Diluent (R&D systems, UK). Après 3 cycles de lavage en PBS-tween, une gamme standard de sRAGE est effectuée en duplicat (0 à 4000 pg/mL) dans du Reagent Diluent. Le plasma est utilisé pur et dosé en duplicat. La gamme et les échantillons sont déposés à raison de 100 µl/puits et incubés à température ambiante pendant 2 h. Après 3 lavages, 100 µl d'anticorps de détection (dilué à 100 ng/mL dans du Reagent Diluent) sont déposés dans chaque puits. La plaque est incubée 2 h à température ambiante puis lavée 3 fois ; 100 µl de streptavidine-HRP dilué au 1/200 sont ensuite ajoutés. Après 20 min d'incubation à température ambiante et 3 lavages successifs, l'activité enzymatique est révélée par l'addition de 100 µl/puits du substrat (Substrate solution, R&D systems, UK). La plaque est maintenue à l'obscurité et la réaction est arrêtée au bout de 20 min en déposant 50 µl d'H₂SO₄ (2N) dans chaque puits. L'adsorbance à 450 nm est mesurée sur un spectrophotomètre lecteur de microplaques.

3.2. TNF-α

La protéine TNF-α est dosée par ELISA dans le plasma, après recueil de sang total et centrifugation 5 min à 3000 g. Un kit commercial Duoset (R&D systems, UK) a été utilisé et nous avons suivi les recommandations du fabricant.

3.3. LTA

La protéine LTA est dosée par ELISA dans le plasma, après recueil de sang total et centrifugation 5 min à 3000 g. Un kit commercial Duoset (R&D systems, UK) a été utilisé et nous avons suivi les recommandations du fabricant.

3.4. HMGB1

La protéine HMGB1 est dosée par ELISA dans le plasma, après recueil de sang total et centrifugation 5 min à 3000 g. Un kit commercial (IBL, international, Germany) a été utilisé et nous avons suivi les recommandations du fabricant.

4. Etude fonctionnelle *in vitro* du polymorphisme *AGER* -429T/C

L'étude fonctionnelle des polymorphismes permet de comprendre à quel niveau la variation d'une base dans la séquence génomique peut influencer la protéine pour laquelle elle code.

4.1. Clonage du promoteur de *AGER*

Le promoteur de *AGER* est amplifié par PCR avec les éléments suivants : 1µl d'ADN (500 ng) est mélangé à 2 µl de chaque amorce (soit 0,2 µMol final de sens (5'-ctttttccctgggttagtg-3') et anti-sens (5'-cttcctccagggtcctg-3')), à 5 µl de Buffer 10x, à 2 µl de dNTP (soit 200 µMol final), à 0,5 µl de Taq polymerase et à 37,5 µl d'eau. Les paramètres de la PCR sont : dénaturation à 94°C pendant 2 min, suivie de 35 cycles de dénaturation-hybridation-élongation (94°C pendant 30 sec, 60°C pendant 30 sec et 72°C pendant 30 sec), puis une dernière étape (72°C pendant 5 min).

Cette étape est suivie d'une migration des échantillons sur un gel d'agarose 1% contenant du BET. La bande est découpée sur le gel puis purifiée à l'aide du kit d'extraction sur mini-colonne, MinElute® kit Gel Extraction (Qiagen, France) selon les instructions du fournisseur. Le promoteur est récupéré et cloné dans un plasmide pCRII-TOPO (Invitrogen, France). Pour cela, 4 µl du produit de PCR purifié sont mélangés à 1 µl de solution salée et 1 µl de vecteur TOPO. Le mélange réactionnel est incubé 5 min à température ambiante et placé ensuite dans la glace avant d'être utilisé pour la transformation bactérienne.

Pour l'amplification du vecteur, des bactéries compétentes (One Shot Invitrogen, France) sont utilisées. Après transformation les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture gélifié supplémenté en ampicilline et en X-gal. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, les colonies sont repiquées et mises en culture sous agitation dans du milieu LB (ou Luria Broth) et de l'ampicilline. Douze heures après, le bouillon de culture est centrifugé 15 minutes à 6000 g à 4°C. Le culot bactérien est récupéré et extrait à l'aide du Hispeed® Plasmid Midi Kit (Qiagen, France) selon les instructions du fournisseur. L'ADN élué est dosé au spectrophotomètre. Le sens d'insertion du promoteur dans le plasmide pCRII-TOPO ainsi que la séquence du promoteur sont vérifiés par séquençage.

4.2. Préparation des vecteurs et mutagenèse dirigée

Nous n'avons malheureusement pas réussi à transférer le promoteur RAGE du plasmide TOPO dans le plasmide luciférase pGL4. Nous avons donc acheté le plasmide RAGE-luciférase (switchgear, US). Le plasmide a tout d'abord été amplifié à l'aide de bactéries compétentes One Shot, comme décrit ci-dessus puis extrait à l'aide du Hispeed® Plasmid Maxi Kit. Un séquençage du plasmide ainsi obtenu a ensuite été réalisé afin de s'assurer que la séquence correspondait à celle désirée, sans le polymorphisme.

La mutagenèse a été réalisée à l'aide d'une PCR avec une sonde comprenant le polymorphisme souhaité en -429 (sens : 5'-aaatgattttctttcacgaagctccaaacaggtttctctcc -tg-3' et antisens 5'-caggagagaaacctgtttggagcttcgtgaaagaaaatcattt-3'). Une amplification dans des bactéries a de nouveau été réalisée (One Shot), suivie d'un séquençage. Deux plasmides avec et sans le polymorphisme ont ainsi pu être obtenus.

4.3. Transfection cellulaire

La transfection cellulaire repose sur l'intégration transitoire d'un vecteur plasmidique dans la cellule. Elle a été réalisée dans une lignée de cellules alvéolaires de type II humaines A549 et dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines, Beas-2b. Les cellules ont été supplémentées dans un milieu Dulbecco's modified Eagle's and Ham's nutrient mixture (medium DMEM-F12), associé à du sérum bovin fœtal (10%) et de la pénicilline G-streptomycine (100 U/mL) et mises en culture dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite été passées dans des plaques 12 puits avec 10⁵ cellules par puits pendant 24 h. Le lendemain les cellules étaient à 50-70% de confluence et pouvaient être transfectées à l'aide d'un mix composé de 1000 ng de plasmide avec ou sans le variant de *AGER*, 100 ng de plasmide pRLTK (plasmide de référence exprimant la luciférase renilla) 5 µL de lipofectine et de l'OptiMEM (Invitrogen, France).

4.4. Lecture luciférase

Dix-huit heures après la transfection les puits sont lavés au PBS. La lecture de la luciférase est réalisée à l'aide du kit « Dual Luciferase Reporter Assay » (Promega, France). Les cellules sont ensuite lysées à l'aide de 250 µL de passive lysis buffer par puits. Les plaques sont disposées sur la glace et agitées 15 minutes. Le plasmide est ensuite déposé à raison de 20 µL par puits sur une plaque Nunc 96 puits. Cent µL de LAR II, reconstitués sont ensuite ajoutés dans chaque puits avant de réaliser la lecture sur Optima. La lecture de la renilla est mesurée après ajout de 100 µL par puits de stop glo 50x dilué dans le assay buffer

II. Un rapport des deux permet ainsi d'évaluer l'expression de la luciférase en fonction du niveau de transfection cellulaire dans chaque puits.

5. Etude *ex vivo* à partir de fibroblastes humains

5.1. Culture et entretien des cellules

5.1.1. Modèle cellulaire

Les fibroblastes sont des cellules différenciées d'origine mésenchymateuse qui présentent de longs prolongements cytoplasmiques. Les fibroblastes, cellules fusiformes ou étoilées de 20 à 30 μm de long, prédominent dans les tissus conjonctifs. Leur richesse en organites cytoplasmiques témoigne de leur grande activité métabolique. Leur principale fonction est la synthèse des éléments de la matrice extracellulaire tels que les fibres de collagène ou d'élastine. Elles ont également un rôle dans la défense antivirale et dans le métabolisme du cholestérol. Les fibroblastes s'apparentent à des cellules de type inflammatoire par leur capacité à migrer, proliférer, s'attacher, modifier leur phénotype, synthétiser et dégrader les molécules du tissu conjonctif, et maintenir l'intégrité tissulaire (Tomasek et al. 2002). Ces cellules sont aussi capables de sécréter d'autres molécules telles que des cytokines, facteurs de croissance ou enzymes, dont les métalloprotéases (Simian et al. 2001), et jouent un rôle important dans les processus de réparation tissulaire ou dans l'entretien des réactions inflammatoires.

Ce sont les principales cellules composant le derme mais on les retrouve également dans tous les tissus de l'organisme.

5.1.2. Culture de fibroblastes

Les fibroblastes se distinguent de beaucoup de types cellulaires par leur capacité à conserver leur morphologie en culture. A confluence, le phénomène d'inhibition de contact contraint les fibroblastes en culture à limiter leur prolifération et à constituer une monocouche cellulaire, caractéristique des fibroblastes normaux. Selon la loi de Hayflick, le nombre de passages des fibroblastes est limité, au-delà duquel ils entrent en sénescence, ne prolifèrent plus.

L'extraction des fibroblastes dermiques humains a été effectuée à partir d'une biopsie de peau d'enfant, après recueil du consentement des parents et sous couvert d'anonymat. Le morceau de peau récupéré a tout d'abord été déposé dans du PBS stérile. La partie dermique est repérée par rapport à la région épidermique avant de découper le fragment en explants de 2-3 mm^2 maximum. Les explants sont déposés au fond d'une flasque de 25 cm^2 ,

si possible côté derme au contact du plastique. Les fibroblastes humains sont cultivés dans du milieu DMEM, soit du Dulbecco's Modified Eagle's Medium avec 4,5 g/L de glucose et de la L-glutamine (Gibco) contenant 20% de sérum de veau fœtal, 100 U/ml de pénicilline G et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco). En 4 à 5 semaines, les fibroblastes sont à confluence dans la flasque. Les cellules sont incubées à 37°C dans 5% de CO₂ et le milieu de culture est changé 2 fois par semaine. Les cellules sont alors trypsinées pour être réensemencées. Les fibroblastes ont été utilisés entre les passages 2 et 8 pour éviter la survenue d'une sénescence.

5.1.3. Entretien des cellules

Les fibroblastes sont cultivés dans des flasques de 75 cm² dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂. Ils sont trypsinés lorsque les flasques sont à confluence et passés dans des plaques 6 ou 12 puits ou dans des flasques. Des culots de cellules ont été congelés dès le second passage au -80°C.

5.1.4. Blocage de la transcription

L'actinomycine D est un antibiotique anti-néoplasique utilisé en biologie comme un antimitotique, et un agent intercalant de l'ADN. Cette molécule se fixe de façon stable à l'ADN, bloquant ainsi la transcription en ARNm. L'actinomycine D (Sigma, France) est ajoutée sur les cellules à confluence, à 1µg/mL selon les recommandations pendant 6h. Le but était de bloquer la transcription, afin d'étudier la stabilité de l'ARNm en présence ou non du variant génétique. Les cellules étaient de nouveau lysées afin d'en extraire l'ARNm.

5.2. Etude de biologie moléculaire

5.2.1. Extraction des ADN et ARN

L'ADN est extrait des cellules à l'aide du kit QIAamp DNA (Qiagen, France). Les prélèvements ont ensuite été géotypés.

Concernant l'ARN, les extractions sont réalisées sur des cellules cultivées en plaque 6 puits dans différentes conditions : sans activation ou après blocage par l'Actinomycine D. Le surnageant est récupéré et les cellules sont lysées à l'aide du tampon de lyse couplé à du β-mercaptoethanol. L'extraction est ensuite réalisée selon le protocole du kit Nucleo Spin RNA II (Macherey Nagel, France) selon les recommandations du fournisseur. Au final, le culot est élué dans 30 µL d'eau distillée et dosé à l'aide d'un spectrophotomètre (nanodrop®).

5.2.2. RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction et PCR semi-quantitative

RT

Pour la transcription inverse (reverse transcription ou RT en anglais), on utilise 1 µg d'ARN que l'on mélange à de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 15,75 µL, auquel on ajoute 1 µL de random primer (40 ng/µl). L'ensemble est incubé 5 minutes à 70°C. On ajoute ensuite le mix composé de 1,25 µL de dNTP (à 10 mM chacun), 5 µL de buffer, 1 µL d'inhibiteur de RNase (RNasin plus) et 1 µL de transcriptase inverse MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) par puits. Le volume réactionnel est incubé à 37°C pendant 1 heure. Les échantillons sont ensuite congelés au -20°C ou utilisés immédiatement.

PCR semi-quantitative

Chaque échantillon de cDNA est ensuite utilisé en triplicat pour réaliser la PCR semi-quantitative, afin de déterminer les niveaux d'expression de transcrits. Le mélange utilisé associe 8 µl de TaqMan® universal PCR Master Mix NO AmpErase UNG (Applied Biosystems, US), 6 µL d'eau et 1 µL de sonde TaqMan Fam couplé à 1 µL de cDNA. La sonde utilisée est une sonde Taqman (Applied Biosystems, Life Technology, France) *HSP70A1B* (Hs 01040501_sH). Les niveaux de transcrits sont normalisés par les niveaux de transcrits *GAPDH*. La réaction de PCR est réalisée à l'aide du thermocycler Step-One-Plus real time PCR (Applied Biosystems, US) pendant 40 cycles.

6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des associations haplotypes/phénotypes ont été réalisées en collaboration avec le Dr Pierre-Yves Boëlle et Pierre-François Busson de l'unité UMR S 707, hôpital St Antoine, Paris. Les résultats sont exprimés en pourcentage, moyenne (+/- écart-type) ou médiane.

L'analyse de l'équilibre de Hardy Weinberg est basée sur un test du Chi-carré à 1 degré de liberté comparant la distribution génotypique observée à la distribution génotypique théorique obtenue à partir de la fréquence des allèles. Le déséquilibre de liaison entre les SNPs d'un même gène est évalué avec le D' de Lewontin, qui prend une valeur entre 0 et 1, où 1 représente un déséquilibre de liaison complet entre deux *loci*.

L'association entre la fonction pulmonaire et le génotype est évaluée en utilisant un modèle de régression linéaire. Le génotype peut, dans ces modèles, être codé de plusieurs manières. On définira m comme l'allèle mineur, et M l'allèle majeur. Un patient aura donc un génotype parmi ces trois combinaisons : mm, mM, MM. L'utilisation du codage génotypique pour la régression permet d'évaluer l'impact sur le phénotype de chacune de ces trois combinaisons individuellement (on a alors affaire à une simple variable qualitative en trois classes). Le codage additif permet d'évaluer l'impact d'une augmentation du nombre

d'occurrences de l'allèle mineur sur le phénotype : on attribue alors la valeur 0 aux patients présentant seulement l'allèle majeur (MM), 1 aux hétérozygotes (mM), et 2 à ceux présentant deux copies de l'allèle mineur (mm). Le codage dominant permet, lui, d'évaluer l'impact de la présence de l'allèle mineur (on oppose alors deux groupes : mm et mM contre MM), et le codage récessif permet d'évaluer l'impact de l'homozygotie sur le phénotype (on oppose cette fois deux groupes : mm contre mM et MM).

L'analyse des données de VEMS (exprimé en % par rapport à la norme établie par les équations de Knudson (Knudson et al. 1976)) et IMC est basée sur un lissage initial des données individuelles par l'utilisation de modèles linéaires à effet aléatoire en fonction de l'âge. Ceci permet d'obtenir une valeur moyenne prédite à la date de dernière visite dont la variance est plus faible que celle de la mesure observée à cette date.

Les équations de Knudson présentent l'inconvénient d'être basées sur une population de référence saine. Afin que les mesures soient comparables entre elles et adaptées à un échantillon de malades de la mucoviscidose, elles sont transformées en utilisant la méthode développée par Kulich, qui exprime le phénotype en quantiles par rapport à la population de même âge, taille et sexe atteinte de la maladie (Kulich et al. 2005).

Enfin, de manière à tenir compte de la mortalité en fonction de l'âge, ces valeurs sont exprimées en KNoRMA (Taylor et al. 2011).

L'association entre la fonction pulmonaire et le génotype est évaluée en utilisant un modèle de régression linéaire.

Tous les tests sont réalisés au niveau $p=0,05$.

RESULTATS

Partie 1. Etude de l'haplotype ancestral AH8.1

1. Etude européenne préliminaire

1.1. Article 1. Ancestral haplotype 8.1 and lung disease severity in European cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros, 2012 Jan;11(1):63-7.

Contexte de l'étude

La mucoviscidose a une expression clinique très variable d'un patient à l'autre. Cette hétérogénéité phénotypique n'est que faiblement corrélée aux mutations du gène *CFTR* et l'intervention de variants génétiques, encore appelés gènes modificateurs, est actuellement suggérée. L'objectif de cette étude était de rechercher une association entre l'haplotype ancestral AH8.1 et la sévérité clinique de la mucoviscidose. Les analyses ont été réalisées dans un groupe de 404 patients européens avec des mutations de *CFTR* variables (Tableau 3).

	Patients européens
Population d'étude, n	404
Age : médiane, [min-max]	15 [6 – 54]
Sexe, femme / homme	183 /221
IMC z-score, médiane [min-max]	-0,49 [-4,54 -3,8]
genotype <i>CFTR</i> , %	
F508del homozygote	56%
F508del heterozygote	34%
Autres mutations	10%

[Tableau 3 Caractéristiques épidémiologiques de la cohorte européenne de patients](#)

Résultats

Cette étude pilote a montré une association entre l'haplotype AH8.1 et la sévérité de l'atteinte respiratoire dans la mucoviscidose estimée par la pente de déclin du VEMS (exprimé en pourcentage prédit selon Knudson et al. (Knudson et al. 1976)). En effet, les patients porteurs de l'haplotype AH8.1 ont une pente de déclin du VEMS significativement plus prononcée que les autres (Figure 19), pente de déclin = -7,6 %, p=0,03 (Corvol et al. 2011)).

(A)

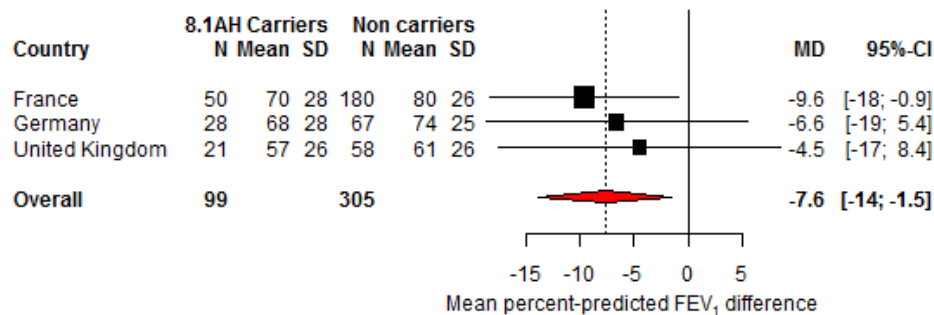


Figure 19 Effets de l'haplotype ancestral AH8.1 sur la fonction respiratoire mesurée par le VEMS chez des patients européens ayant la mucoviscidose

Afin d'affiner nos résultats, 2 groupes de patients au sein de chaque pays ont été comparés, séparés selon les mutations de *CFTR* : les patients homozygotes pour la mutation F508del et les patients non homozygotes pour cette mutation (Figure 20, D/D vs autre, respectivement). Cette analyse met en évidence que l'haplotype AH8.1 est associé à la sévérité de l'atteinte respiratoire essentiellement chez les patients non homozygotes F508del, quel que soit le pays concerné ($p=0,004$).

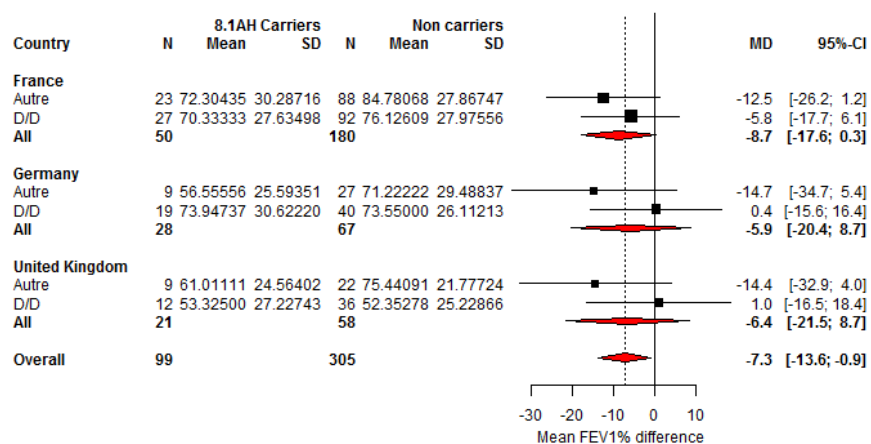


Figure 20 Effets de l'haplotype ancestral 8.1AH sur la fonction respiratoire mesurée par le VEMS en fonction des mutations de CFTR (D/D : F508del homozygotes, Autres : autres mutations de CFTR toutes sévérités confondues)

1.2. Résultats complémentaires

Des données phénotypiques supplémentaires ont pu être recueillies pour 72 enfants suivis à l'hôpital Trousseau : mesure de la PaO₂ et des taux plasmatiques d'immunoglobulines A, G et M. Parmi ces 72 enfants, 9 sont porteurs de l'haplotype AH8.1. Aucune différence n'est

observée entre les 2 groupes pour la PaO₂, les IgG et A (p=0,76 ; 0,70 et 0,85 respectivement). Les taux d'IgM sont par contre significativement diminués chez les individus porteurs de l'haplotype AH8.1 ($1,16 \pm 0,49$ mg/L chez les porteurs contre $0,69 \pm 0,17$ mg/L chez les non porteurs, p=0,016).

1.3. Discussion

La variabilité phénotypique observée dans la mucoviscidose a amené à rechercher l'implication de gènes modificateurs et plus récemment d'haplotypes impliquant plusieurs gènes en déséquilibre de liaison. Cette étude préliminaire suggère que l'haplotype ancestral AH8.1 est associé à une plus grande sévérité de l'atteinte respiratoire chez des patients européens atteints de mucoviscidose. Cet haplotype avait déjà été associé à une inflammation incontrôlée dans diverses pathologies telles que le lupus ou le cancer colorectal (Candore et al. 2003; Toth et al. 2007). Or dans la mucoviscidose, l'atteinte respiratoire est caractérisée par une inflammation pulmonaire exacerbée et fortement impliquée dans la morbi-mortalité (Regamey et al. 2010). Trois des 4 variants de cet haplotype codent pour des cytokines pro-inflammatoires (RAGE, TNF et LTA). Le 4^{ème} code pour une protéine chaperonne (HSP) prenant en charge les protéines mal repliées, parmi lesquelles CFTR mutée. L'ensemble de ces protéines active les voies des MAPK et NF-κB, qui sont connues comme étant dérégulées dans la mucoviscidose (Muselet-Charlier et al. 2007; Vij et al. 2009; Hunter et al. 2010). Dans ce travail, nous n'avons pas observé d'association entre chacun des variants étudiés séparément et la sévérité de l'atteinte pulmonaire.

Dans la mucoviscidose, cet haplotype avait déjà été étudié chez 72 patients porteurs de différentes mutations de *CFTR* (Laki et al. 2006). Les auteurs avaient montré que les patients porteurs de l'haplotype AH8.1 étaient colonisés plus tardivement par *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Ils concluaient que, par son effet sur l'inflammation, l'haplotype pouvait favoriser la réponse immunitaire contre ces pathogènes. Nous n'avons pas répliqué ces résultats dans cette étude. Une autre étude réalisée chez des sujets sains a montré également un effet protecteur de l'haplotype face aux infections pulmonaires (Aladzsity et al. 2011).

Sur le plan physiopathologique, il semble que cet haplotype pourrait influencer sur le taux d'immunoglobuline, notamment en diminuant la sous-classe d'IgG2, ce qui, au contraire, diminuerait la clairance bactérienne et favoriserait les colonisations (Candore et al. 2007). Dans notre étude, nous ne retrouvons pas d'association entre la présence de l'haplotype et les taux d'IgG, mais nous ne disposons pas du dosage des sous-classes. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence une association entre la présence de l'haplotype AH8.1 et des

taux d'IgM abaissés. Il faut souligner que ces résultats ont été obtenus dans un petit groupe d'enfants porteurs de différentes mutations du gène *CFTR* et nécessitent donc d'être validés dans une plus large cohorte, si possible homogène.

En conclusion, nous avons mis en évidence une association entre l'haplotype AH8.1 et la sévérité de l'atteinte respiratoire dans une cohorte de patients européens atteints de mucoviscidose. Cependant, toute étude d'association génotype/phénotype nécessite une réplication / validation dans des cohortes indépendantes, c'est donc le travail que nous avons ensuite réalisé (*voir ci-dessous*).

Short Communication

Ancestral haplotype 8.1 and lung disease severity in European cystic fibrosis patients[☆]

Harriet Corvol^{a, b, *, 1}, Julie Beucher^{a, 1}, Pierre-Yves Boëlle^{b, c}, Pierre-François Busson^c, Céline Muselet-Charlier^a, Annick Clement^{a, b}, Felix Ratjen^d, Hartmut Grasemann^d, Judith Laki^e, Colin N.A. Palmer^f, J. Stuart Elborn^g, Anil Mehta^e

^a AP-HP, Hôpital Trousseau, Pediatric Pulmonary Department; Inserm U938, Paris, France

^b Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France

^c AP-HP, Hôpital St Antoine, Biostatistics Department, Inserm UMR-S707, Paris, France

^d Division of Respiratory Medicine, Department of Pediatrics, the Hospital for Sick Children, and University of Toronto, Toronto, Canada

^e Division of Medical Sciences, University of Dundee, Dundee, United Kingdom

^f Biomedical Research Institute, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, DD1 9SY, United Kingdom

^g Respiratory Medicine Group, Queen's University of Belfast, Belfast, United Kingdom

Received 10 July 2011; received in revised form 12 September 2011; accepted 17 September 2011

Available online 10 October 2011

Abstract

Background: The clinical course of cystic fibrosis (CF) lung disease varies between patients bearing identical *CFTR* mutations. This suggests that additional genetic modifiers may contribute to the pulmonary phenotype. The highly conserved ancestral haplotype 8.1 (8.1AH), carried by up to one quarter of Caucasians, comprises linked gene polymorphisms on chromosome 6 that play a key role in the inflammatory response: *LTA* +252A/G; *TNF* −308G/A, *HSP70-2* +1267A/G and *RAGE* −429T/C. As inflammation is a key component inducing CF lung damage, we investigated whether the 8.1AH represents a lung function modifier in CF.

Methods: We analyzed the lung function of 404 European CF patients from France ($n=230$), Germany ($n=95$) and UK ($n=79$). FEV₁ differences between 8.1AH carriers and non-carriers were calculated in each country and pooled using a random effects model.

Results: The frequency of 8.1AH carriers was similar between French (22%), German (29%) and UK (27%) patients. We found that 8.1AH carriers had significantly lower FEV₁, adjusted for age classes and countries ($P<0.04$, mean FEV₁ difference −6.4% CI95% [−12.4%, −0.5%]). No difference was observed with respect to BMI Z-scores and chronic colonization with *P. aeruginosa*.

Conclusions: These findings support the concept that 8.1AH is an important genetic modifier of lung disease in CF. To conclude, multiple linked genes outside the CF locus might explain some of the variability in lung phenotype.

© 2011 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cystic fibrosis; 8.1 Ancestral Haplotype; Modifier genes; Lung function

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) is a common inherited disease that gradually destroys the lung and is found mainly in people of European

descent [1]. Compelling data on phenotypic variability and the lack of genotype-phenotype correlation among either siblings or unrelated patients with identical mutations in the *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (*CFTR*) gene has led to

[☆] These data have been presented in conferences: NACFC 2010—Baltimore (Pediatric Pulmonology 2010, supplement 33: abstract page 282) and ECFC 2011—Hamburg (invited talk—genetics symposium).

* Corresponding author at: Hôpital Trousseau, Pediatric Pulmonary Department, 26, avenue du Dr Netter; 75012 Paris, France. Tel.: +33 1 44 73 61 74; fax: +33 1 44 73 67 18.

E-mail address: harriet.corvol@trs.aphp.fr (H. Corvol).

¹ Equally contributed.

the suggestion that gene modifiers may affect the lung phenotype [2,3]. However, the problem with the studies which have tried to associate the severity of CF lung disease with modifier genes, for example those involved in the innate or acquired immune response, is that candidate polymorphisms have a very low prevalence in the community at large. Thus it either follows that CF phenotypic variability is a mosaic of different rare modifiers or that some highly prevalent but unknown co-inherited factors are at work. With respect to the first idea, replicated results suggest that single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *transforming growth factor B1* (*TGFB1*) [4–6] and *mannose binding lectin 2* (*MBL2*) [7,8] genes might explain a small percentage of the observed phenotypic variability. Here, we test the second idea that differential co-inheritance of a latent but highly prevalent cassette of linked genes (haplotypes) might underpin the observed variability in lung function. The term haplotype refers to the block structure of a genetic region and haplotype differences mean that the discrepancies may arise from differences in distribution of more than one allele in combination with others. Some haplotypes have a high prevalence in Europe and we wondered if one of these could contribute to disease variability in large numbers of CF patients.

The highly conserved ancestral haplotype 8.1 (8.1AH) is encoded in the major histocompatibility complex (MHC) region on the short arm of chromosome 6 [9]. 8.1AH appeared to be a good candidate because it is carried by up to one quarter of Caucasians and comprises a cassette of linked alleles that play key roles in the inflammatory response: *LTA* +252A/G (Lymphotoxin A), *TNF*–308G/A (Tumor necrosis factor), *HSP70-2* +1267A/G (Heat shock protein) and *RAGE*–429T/C (Receptor for Advanced Glycation Endproducts). Moreover, 8.1AH has been associated with delayed onset of lung bacterial colonization in CF patients in a small cohort of Hungarian patients [10]. As airway inflammation is a key component inducing CF lung damage, we investigated whether the 8.1AH represents such modifier in European CF patients from France, UK and Germany.

2. Methods

The study population consisted of a total of 404 European CF patients (adults and children), enrolled from 6 CF centers in France (230 children); one CF center in Germany (95 children) and one CF center in UK (79 adults). The study was approved by the ethical committees of the Medical Review Board of each participating CF center in France, Germany and UK; and written informed consent was obtained for each patient. The diagnosis of CF was made on the basis of two abnormal sweat chloride test results (>60 mmol/L) and/or identification of *CF-causing* mutations [11]. Clinical, biological and functional data were obtained from hospital records from the previous 2 to 5 years in France, Germany and UK. The data were gathered by a single physician for each country, blinded to the results of patient's haplotypes. Recorded data included date of birth, sex, *CFTR* genotype, pulmonary function tests, nutritional status and airways microbiology. Lung function was assessed by spirometry in children >6 years during periods

of clinical stability. Respiratory microbial flora was determined by microscopy and culture of lower respiratory tract secretions or throat swabs realized every 3 months in all the CF centers. Chronic airway colonization with *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) was defined by the persistence of the pathogen in at least three airway samples for at least 6 months. Nutritional status was appreciated by the Z-score for the body mass index (BMI).

Genotyping were performed by real time polymerase chain reaction (PCR), using a 2700 thermocycler and the conventional Taqman primers and probes (Applied Biosystems, Foster City, USA). Allelic discrimination was realized by endpoint measurements with specific fluorescent oligonucleotides (detection system software of the ABI prism 7000). We typed 4 linked polymorphisms of the 8.1AH: *LTA* +252A/G (rs909253, NC_000006.11:g.31540313A>G), *TNF*–308G/A (rs1800629, NC_000006.11:g.31543031G>A), *HSP70-2* +1267A/G (rs1061581, NC_000006.11:g.31784586G>A) and *RAGE*–429T/C (rs1800625, NC_000006.11:g.32152442A>G).

Haplotypes were reconstructed using the EM algorithm, using genotypes at the 4 linked polymorphisms [12]. As influence of 8.1 AH carriage on phenotype has been described either with the whole haplotype, i.e. carriage of the 4 variants simultaneously, or with part of its constituents, i.e. 3 out of the 4 variants, we defined 8.1AH when at least one haplotype included at least 3 variants among: *LTA* +252G, *TNF*–308A, *HSP70-2* +1267G and *RAGE*–429C [9,13]. The association in 8.1AH carriage and age was tested using Cochran–Armitage test for trend. BMI Z-scores were calculated using the WHO 2007 growth reference [14]. Colonization at age 18 was calculated using the Kaplan–Meier method and compared using the log-rank test stratified on country. Forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) was standardized for age and sex by computing percent-predicted relative to reference Knudson equations [15,16]. Mean percent-predicted FEV₁ differences between 8.1AH carriers and others were calculated in each country and age class and pooled using a random effects model. Heterogeneity between FEV₁ differences in the country/age class subgroups was tested using Cochran's *Q* statistic. The same analysis was done for BMI Z-scores and CF specific centiles Z-scores.

All analyses were made using the R software.

3. Results

The clinical characteristics of the study population are listed in Table 1. Median current age was 11.3 years for the French, 16 years for the German and 26.5 years for the UK patients. Most of the individuals were pancreatic insufficient (93%) and about half were female. Similar to the distribution of *CFTR* mutations in CF European patients, 56% were homozygous for the p.Phe508del *CFTR* mutation and 34% p.Phe508del compound heterozygous. Distribution of the 8.1AH carriers was similar to that observed in Caucasians [9] and similar across the 3 populations: 22% in the French; 29% in the German CF and 27% in the UK patients (Chi-squared test=2.4; *P*=0.30). The frequency

Table 1
Clinical characteristics of the study population.

	France	Germany	UK
Study population, <i>n</i>	230	95	79
Current age : median [range]	11 [6–18]	16 [6–18]	26.5 [23–54]
Sex, female / male	108/122	39/56	36/43
<i>CFTR</i> genotype, %			
<i>F508del</i> homozygous	52%	62%	61%
<i>F508del</i> compound heterozygous	37%	35%	24%
Other mutations	11%	3%	15%
Pancreatic insufficiency, %	92%	98%	91%
BMI Z-score : median [range]	−0.49 [−3.33;3.80]	−0.63 [−4.54;1.24]	−0.37 [−2.77;3.26]
<i>P. aeruginosa</i> colonization at age 18, % [95% CI]	51% [41%–63%]	43% [33%–57%]	82% [74%–91%]
8.1AH carriers	22%	29%	27%

of 8.1AH carriers did not change markedly with age (trend test, $P=0.18$).

FEV₁% predicted was smaller in 8.1AH carriers in each country and age class except in UK patients aged [26–30], with little heterogeneity among age classes and countries (Cochran's Q statistic for heterogeneity, $P=0.99$). The random-effect pooled difference showed that 8.1AH carriers had significantly lower FEV₁% predicted overall ($P<0.04$, mean FEV₁ percent predicted difference, carriers vs. non carriers −6.4% CI95% [−12.4%, −0.5%], Fig. 1).

Differences in BMI Z-scores according to 8.1 AH carriage were not always in the same direction, fluctuating around 0 (Fig. 2); Cochran's Q statistic for heterogeneity, $P=0.20$). The pooled measure did not reveal any difference in nutritional status according to 8.1AH carriage ($P=0.76$). Finally, chronic colonization with *P. aeruginosa* was not different according to ancestral carriage ($P=0.99$).

4. Discussion

The key novel finding of the present study is that co-inheritance of a widely prevalent ancestral haplotype 8.1AH is associated with a greater lung disease severity in CF manifesting as a significantly lower FEV₁ across the 3 European populations including children and adults. Our data also suggest that in modifier gene studies, genetic associations at the haplotype level may be more informative rather than focusing on individual SNPs [17]. Moreover, our data are consistent with the current understanding of the roles of 8.1AH in the inflammatory response. 8.1AH has indeed been associated with excessive and uncontrolled inflammation in various inflammatory disorders [18,19]. In CF, inflammation is believed to drive the progressive destruction of the lung and the decline in lung function which is responsible for the major morbidity and mortality [20]. 8.1AH comprises linked polymorphisms of major pro-inflammatory cytokines including LTA, TNF, HSP and RAGE. TNF α and LTA are 2 key members of the TNF superfamily involved in the inflammatory response. HSP70-2 protects other proteins against aggregation and mediates the folding of newly translated proteins. In CF, protein misfolding is thought to contribute to disease pathogenesis [21]. RAGE is a member of the immunoglobulin superfamily, highly expressed in pulmonary tissues and acts as a pro-inflammatory mediator *via* MAP kinases and NF κ B pathways activation which are both abnormal in CF [22–24]. Moreover, neutrophils from CF airways have been shown to express increased levels of RAGE [25]. The potential involvement of this haplotype in CF phenotypic differences is consistent with the early onset, excessive and persistent airway inflammation that is due partly to an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines in CF.

Critically, had we followed the classical single polymorphism approach, we would have found no association between individual *LTA*, *TNF*, *HSP* and *RAGE* single SNPs and lung function in our European cohort (data not shown) and yet we

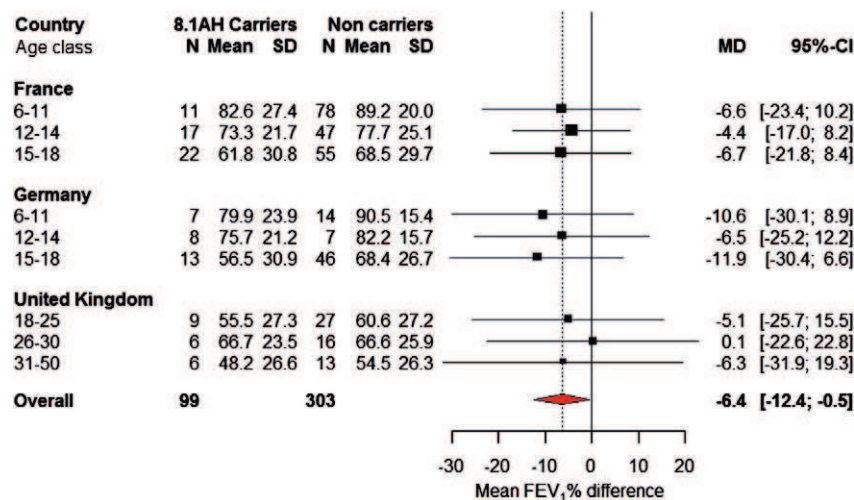


Fig. 1. Ancestral haplotype 8.1 AH carriage and FEV₁ in European patients with cystic fibrosis. FEV₁ differences were calculated in each country and age class and are shown as black squares with 95% confidence interval (segments). A random-effects pooled estimate of the FEV₁ difference according to 8.1AH carriage is shown as the bottom diamond, centered on the mean difference and extending to the limits of the pooled 95% confidence interval. On average, FEV₁ was significantly lower in 8.1 AH carriers ($P<0.04$).

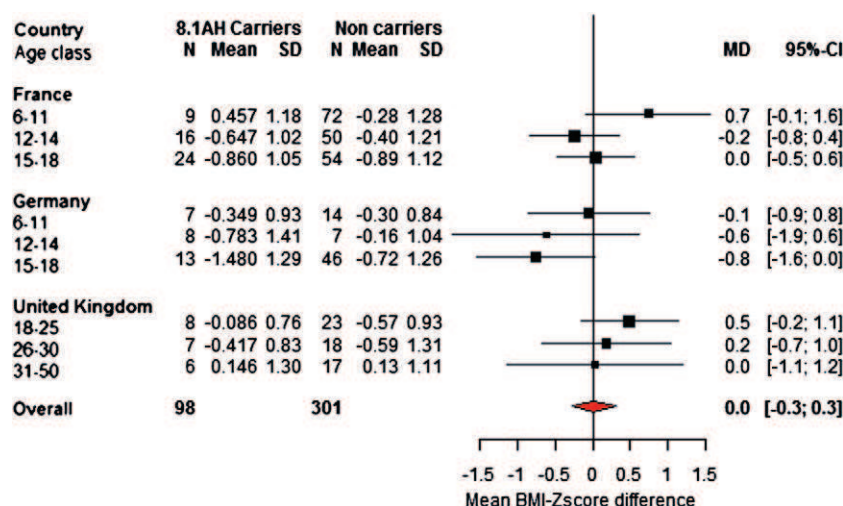


Fig. 2. Ancestral haplotype 8.1 AH carriage and Body Mass Index in European patients with cystic fibrosis. BMI Z-score differences were calculated in each age class and country and are shown as black squares with 95% confidence interval (segments). A random-effects pooled estimate of the BMI Z-score difference according to 8.1AH carriage is shown as the bottom diamond, centered on the mean difference and extending to the limits of the 95% confidence interval. There was no difference between 8.1 AH carriers and non carriers ($P=0.76$).

found a significant association with the 8.1AH. The *TNF* -308G/A genotype has been previously explored as potential lung disease modifier in different CF populations, but conflicting results have been shown so far [5,6,26–28]. An association between haplotypes including *TNF* variants with CF lung severity was first proposed by Yarden et al. [29]. They studied 3 variants in the *TNF* promoter (-851C/T, -308G/A, -238G/A) and one in the *LTA* 1st intron (+691Gins/del) in 180 European p.Phe508del homozygous CF children (58 from Belgium and 122 from the Czech Republic). They found no association for *TNF*-308G/A or *TNF*-238G/A but patients heterozygous for *LTA* +691Gins/Gdel were more likely to have a better lung function compared to patients homozygous for *LTA* +691Gins; furthermore they observed a higher proportion of *TNF*-851C carriers in the group of patients with an FEV₁ below 70% predicted. These results led them to suggest that associations between the *TNF* gene and CF phenotypes could involve haplotypes rather than single genotypes. The interpretation of single locus associations has indeed several limitations, and there is evidence that in a complex disease such as CF, analyses based on haplotypes can provide additional power in detecting significant association [4].

In CF, association between 8.1AH and lung disease has been previously explored by Laki et al. in 72 CF patients, 39 of which were p.Phe508del homozygote and 33 p.Phe508del compound heterozygous [10]. They showed that 8.1AH was associated with delayed onset of respiratory colonization with *Staphylococcus aureus* and *P. aeruginosa*, two major pathogens associated with lung disease severity in CF. They concluded that the excessive inflammatory response associated with the 8.1AH may influence the defense system efficiency against some microorganisms. Another recent study also suggests a protective effect of 8.1AH carriage in a healthy population with severe pulmonary infection [30]. Several alterations of the immune response have also been shown to be correlated

to AH 8.1, and even immunoglobulin (Ig) levels seem to be influenced by this haplotype [31,32]. Interestingly, Candore et al. have shown that 8.1AH carriers had decreased IgG2 serum levels, which might decrease bacterial clearance and favor chronic colonization [33]. Larger populations of CF patients of European origin are now being assembled, that will help study this issue further [34]. For example, it might be that an elevated inflammatory response is beneficial in the early stages of childhood CF but ultimately becomes destructive as chronic infection ensues in older patients.

In summary, our findings support the concept that the very common 8.1AH that is randomly co-inherited with defects in *CFTR*, appears to be an important genetic modifier of lung disease in CF in up to one quarter of patients. Interestingly, this highly conserved ancestral haplotype contains a cassette of linked genes that play a key role in the inflammatory response which together could be involved in the excessive airway inflammation in CF.

Funding sources

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Pierre et Marie Curie Paris, Agence Nationale de la Recherche, DGS, Association Vaincre La Mucoviscidose, Chancellerie des Universités (Legs Poix), Association Agir Informer Contre la Mucoviscidose, GIS-Institut des Maladies Rares. JB was supported by Rennes CHU-Hospital. JL was supported by a grant from Tayside R&D awarded to AM in Dundee.

Conflict of interest statement

None of the authors have any commercial or other associations that might pose a conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the families and the patients for their participation. We would also like to thank the numerous health care providers and community clinics for their support and participation. Finally, we would like to especially thank Pr Jacques Brouard Dr. François Bremont, Dr. Bertrand Delaisi, Pr. Jean-François Duhamel, Pr. Christophe Marguet, and Pr. Michel Roussey for all of their effort towards the study.

References

- [1] O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* May 30 2009;373(9678):1891–904.
- [2] Stanke F, Becker T, Kumar V, et al. Genes that determine immunology and inflammation modify the basic defect of impaired ion conductance in cystic fibrosis epithelia. *J Med Genet* Jan 2011;48(1):24–31.
- [3] Vanscoy LL, Blackman SM, Collaco JM, et al. Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* May 15 2007;175(10):1036–43.
- [4] Bremer LA, Blackman SM, Vanscoy LL, et al. Interaction between a novel TGFB1 haplotype and CFTR genotype is associated with improved lung function in cystic fibrosis. *Hum Mol Genet* Jul 15 2008;17(14):2228–37.
- [5] Corvol H, Boelle PY, Brouard J, et al. Genetic variations in inflammatory mediators influence lung disease progression in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* Dec 2008;43(12):1224–32.
- [6] Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, et al. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* Oct 6 2005;353(14):1443–53.
- [7] Garred P, Pressler T, Madsen HO, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999;104(4):431–7.
- [8] McDougal KE, Green DM, Vanscoy LL, et al. Use of a modeling framework to evaluate the effect of a modifier gene (MBL2) on variation in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* Jun 2010;18(6):680–4.
- [9] Kiszal P, Kovacs M, Szalai C, et al. Frequency of carriers of 8.1 ancestral haplotype and its fragments in two Caucasian populations. *Immunol Invest* 2007;36(3):307–19.
- [10] Laki J, Laki I, Nemeth K, et al. The 8.1 ancestral MHC haplotype is associated with delayed onset of colonization in cystic fibrosis. *Int Immunol* Nov 2006;18(11):1585–90.
- [11] Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* Aug 2008;153(2):S4–S14.
- [12] Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* Sep 1995;12(5):921–7.
- [13] Laki J, Kiszal P, Vataj A, et al. The HLA 8.1 ancestral haplotype is strongly linked to the C allele of -429T>C promoter polymorphism of receptor of the advanced glycation endproduct (RAGE) gene. Haplotype-independent association of the -429C allele with high hemoglobinA1C levels in diabetic patients. *Mol Immunol* Jan 2007;44(4):648–55.
- [14] de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ* Sep 2007;85(9):660–7.
- [15] Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B. Changes in the normal maximal expiratory flow–volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis* Jun 1983;127(6):725–34.
- [16] Rosenfeld M, Pepe MS, Longton G, Emerson J, FitzSimmons S, Morgan W. Effect of choice of reference equation on analysis of pulmonary function in cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* Mar 2001;31(3):227–37.
- [17] Stanke F, Becker T, Cuppens H, et al. The TNFalpha receptor TNFRSF1A and genes encoding the amiloride-sensitive sodium channel ENaC as modulators in cystic fibrosis. *Hum Genet* Apr 2006;119(3):331–43.
- [18] Candore G, Modica MA, Lio D, et al. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: a genetically determined defect of C4 influences immunological parameters of healthy carriers of the haplotype. *Biomed Pharmacother* Sep 2003;57(7):274–7.
- [19] Toth EK, Kocsis J, Madaras B, et al. The 8.1 ancestral MHC haplotype is strongly associated with colorectal cancer risk. *Int J Cancer* Oct 15 2007;121(8):1744–8.
- [20] Regamey N, Jeffery PK, Alton EW, Bush A, Davies JC. Airway remodeling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax* Jul 2011;66(7):624–9.
- [21] Luciani A, Vilella VR, Esposito S, et al. Defective CFTR induces aggregate formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* Sep 2010;12(9):863–75.
- [22] Hunter MJ, Trehame KJ, Winter AK, Cassidy DM, Land S, Mehta A. Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PLoS One* 2010;5(7):e11598.
- [23] Muselet-Charlier C, Roque T, Boncoeur E, et al. Enhanced IL-1beta-induced IL-8 production in cystic fibrosis lung epithelial cells is dependent of both mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB signaling. *Biochem Biophys Res Commun* Jun 1 2007;357(2):402–7.
- [24] Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS One* 2009;4(2):e4664.
- [25] Makam M, Diaz D, Laval J, et al. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* Apr 7 2009;106(14):5779–83.
- [26] Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, et al. End-organ dysfunction in cystic fibrosis: association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med* Feb 1 2003;167(3):384–9.
- [27] Hull J, Thomson AH. Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 1998;53(12):1018–21.
- [28] Schmitt-Grohe S, Stuber F, Book M, et al. TNF-alpha promoter polymorphism in relation to TNF-alpha production and clinical status in cystic fibrosis. *Lung* Mar-Apr 2006;184(2):99–104.
- [29] Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, et al. Association of tumour necrosis factor alpha variants with the CF pulmonary phenotype. *Thorax* Apr 2005;60(4):320–5.
- [30] Aladzsity I, Madach K, Szilagyi A, et al. Analysis of the 8.1 ancestral MHC haplotype in severe, pneumonia-related sepsis. *Clin Immunol* Jun 2011;139(3):282–9.
- [31] Modica MA, Freddi S, Caruso C. Blood IgA, IgM and IgE levels are influenced by sex and HLA phenotype. *Exp Clin Immunogenet* 1989;6(4):251–7.
- [32] Mohammadi J, Ramanujam R, Jarefors S, et al. IgA deficiency and the MHC: assessment of relative risk and microheterogeneity within the HLA A1 B8, DR3 (8.1) haplotype. *J Clin Immunol* Jan 2011;30(1):138–43.
- [33] Candore G, Campagna AM, Cuppari I, Di Carlo D, Mineo C, Caruso C. Genetic control of immune response in carriers of the 8.1 ancestral haplotype: correlation with levels of IgG subclasses: its relevance in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* Sep 2007;1110:151–8.
- [34] McCormick J, Mehta G, Olesen HV, Viviani L, Macek Jr M, Mehta A. Comparative demographics of the European cystic fibrosis population: a cross-sectional database analysis. *Lancet* Mar 20 2010;375(9719):1007–13.

2. Réplication des résultats de l'haplotype AH8.1 dans une cohorte de patients F508del homozygotes

2.1. Population d'étude

Comme introduit ci-dessus, le but de ce travail était de valider les résultats de l'association entre l'haplotype AH8.1 et la sévérité de l'atteinte pulmonaire. Pour cela, nous avons décidé dans un premier temps d'analyser une large cohorte homogène de patients. A partir du projet national de recherche des gènes modificateurs, nous avons sélectionné 1039 patients homozygotes pour la mutation F508del et ayant 2 parents d'origine européenne. Les caractéristiques des patients figurent dans le [Tableau 4](#) ci-dessous :

Population d'étude, n	1039
Age, médiane [rang]	19,9 [6-57,6]
Sexe, femme / home	499/540
IMC z-score, médiane [rang]	-0,76 [-4,95-2.08]
genotype <i>CFTR</i> , % <i>F508del</i> homozygote <i>F508del</i> heterozygote Autres mutations sévères	100%
Porteurs de l'AH8.1, n (%)	158 (15,2 %)
Kulich, Z-score théorique, médiane [rang]	-0,09 [-2,33-2,33]
KNoRMA, Z-score théorique, médiane [rang]	0,28 [-1,84-3,26]

[Tableau 4 Caractéristiques épidémiologiques et génotypiques de la cohorte homogène F508del](#)

2.2. Résultats

La distribution de la fonction respiratoire (VEMS en percentiles selon le score de Kulich et en pourcentage prédit selon Knudson et al.) est rapportée dans les figures ci-dessous ([Figure 21](#) a. et b. respectivement):

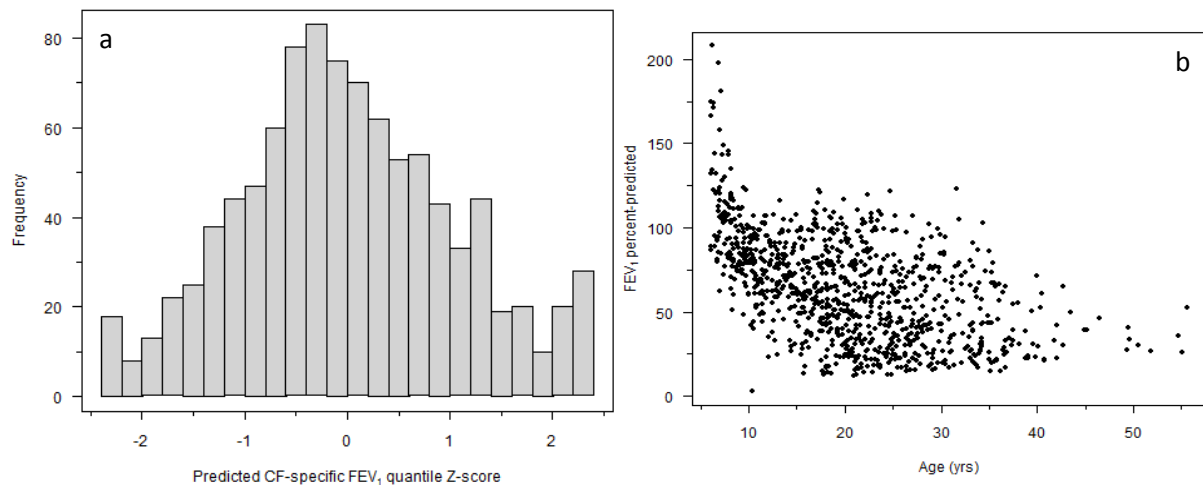


Figure 21 Distribution de la fonction respiratoire dans la cohorte. A. Distribution du Z-score de Kulich. B. Distribution du VEMS en pourcentage prédit en fonction de l'âge.

La proportion d'individus porteurs de l'haplotype ancestral AH8.1 est comparable à celle observée dans la population européenne (Kiszel et al. 2007). Dans ce groupe de patients, nous n'observons pas d'association entre la fonction pulmonaire et la présence de l'haplotype AH8.1, tant pour le score de Knudson ($p=0,44$), le score de Kulich ($p=0,41$) ou le KNoRMA ($p=0,88$) (Figure 22 pour le VEMS selon Knudson).

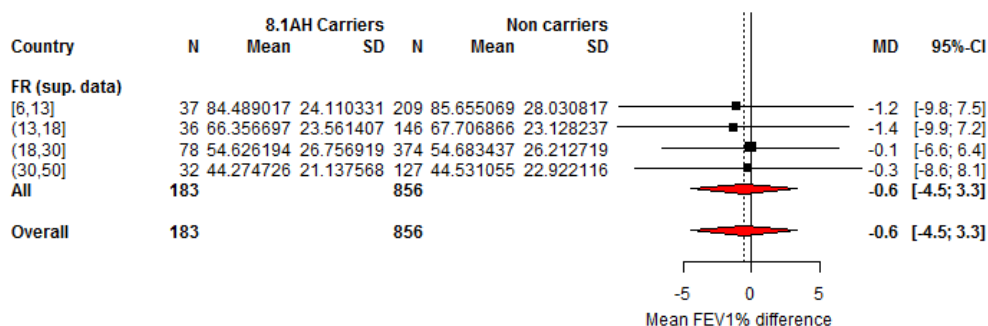


Figure 22 Effets de l'haplotype ancestral 8.1AH sur la fonction respiratoire mesurée par le VEMS chez des patients français F508del homozygotes

2.3. Discussion

Dans cette large cohorte de patients homozygotes pour la mutation F508del, nous n'observons pas d'association entre l'haplotype AH8.1 et la sévérité de l'atteinte pulmonaire.

Les analyses réalisées dans la première cohorte de patients européens (figure 17) avaient mis en évidence que l'association était essentiellement visible chez les patients non homozygotes pour la mutation F508del, ce qui pourrait expliquer l'absence de réplique ici. Il était donc nécessaire de poursuivre cette étude de validation à la fois chez des patients ayant des génotypes *CFTR* sévères non F508del homozygotes, ainsi que chez des patients ayant des génotypes *CFTR* intermédiaires (voir ci-dessous).

3. Réplication des résultats de l'haplotype AH8.1 dans une cohorte de patients sévères non F508del homozygotes

3.1. Population d'étude

Compte tenu de l'absence de validation de l'association entre haplotype AH8.1 et la sévérité de l'atteinte respiratoire dans la cohorte de patients homozygotes F508del, nous avons poursuivi notre étude de validation en sélectionnant de nouveaux patients à partir du projet national de recherche des gènes modificateurs : les patients ayant soit 2 mutations sévères de *CFTR*, associées à une insuffisance pancréatique exocrine (classe I, II ou III), soit les patients ayant des mutations plus modérées. Cependant, à ce jour, seuls 145 patients ont pu être inclus dans cette validation, ayant à la fois des données phénotypiques et de l'ADN collectés. Tous ont des génotypes sévères (non F508del homozygotes), associés à une insuffisance pancréatique exocrine.

Les caractéristiques des patients figurent dans le [Tableau 5](#) ci-dessous :

Population d'étude, n	145
Age, médiane [rang]	20,7 [6,1-57]
Sexe, femme / homme	70/76
IMC z-score, médiane [rang]	-0,51 [-4,16-2,34]
genotype <i>CFTR</i> , %	
F508del homozygote	0%
F508del heterozygote	31%
Autres mutations sévères	69%
Porteurs de l'AH8.1, n (%)	23 (15,9%)
Kulich, Z-score théorique, médiane [rang]	-0,06 [-2,33-2,33]
KNoRMA, Z-score théorique, médiane [rang]	0,34 [-1,78-2,85]

[Tableau 5 Caractéristiques épidémiologiques et génotypiques des patients sévères non F508del homozygotes](#)

3.2. Résultats

Dans cette plus petite cohorte, la proportion d'individus porteurs de l'haplotype ancestral AH8.1 est encore une fois comparable à celle observée dans la population européenne (Kiszel et al. 2007). Les caractéristiques staturo-pondérales et de fonction respiratoire sont comparables au groupe précédent.

L'analyse d'association entre l'haplotype AH8.1 et la fonction respiratoire est préliminaire car la cohorte est restreinte et doit s'enrichir. A cette date, le portage de l'haplotype AH8.1 n'est pas associé au phénotype respiratoire, tant pour le score de Knudson $p=0,83$, le score de Kulich $p=0,41$ ou le KNoRMA $p=0,14$.

3.3. Discussion

Ainsi, les analyses sont en cours dans ce groupe de patients qui doit s'enrichir avant toute conclusion. En effet, bien que l'association avec la sévérité de l'atteinte respiratoire ne soit pas significative à ce jour, l'effectif réduit de cette cohorte de patients non F508del homozygotes par rapport aux précédents ne permet pas encore de conclure.

RESULTATS

Partie 2. Etude des variants composant l'haplotype AH8.1

4. Etude de polymorphisme *AGER* -429T/C

4.1. Article 2. *AGER* -429T/C is associated with an increased lung cystic fibrosis disease severity

Contexte de l'étude

Le gène *AGER*, codant pour la protéine RAGE, semblait être un bon candidat en tant que gène modificateur. En effet, ce gène est un constituant de l'haplotype AH8.1 qui avait précédemment été impliqué dans la sévérité de l'atteinte pulmonaire. De plus, il a récemment été identifié dans une étude de GWAS réalisée dans une cohorte de sujets sains comme étant associé à une détérioration de la fonction respiratoire (Hancock et al. 2010; Repapi et al. 2010).

Les analyses ont été réalisées dans un groupe de 967 patients français homozygotes pour la mutation F508del. Pour déterminer si le polymorphisme *AGER* -429T/C a un impact sur l'activité du promoteur, un plasmide rapporteur luciférase contenant ou non le polymorphisme a été transfecté dans des lignées cellulaires A549 et Beas-2-b. L'activité de la luciférase a été rapportée à l'expression de renilla afin de rapporter au niveau de transfection, puis les niveaux de luciférase ont été comparés entre le plasmide contenant -429T ou -429C.

Résultats

La répartition du polymorphisme dans notre population est comparable à celle observée dans la population caucasienne ([Tableau 6](#), d'après Hapmap).

Génotypage <i>AGER</i> -429T/C	Nombre de patients, n (%)	Fréquence Hapmap, %
TT	709 (73,3 %)	71,7%
TC	235 (24,3 %)	25,7%
CC	23 (2,4 %)	2,7%

[Tableau 6 Répartition du génotype de *AGER* -429T/C](#)

Dans cette large cohorte, il existe une association significative entre la présence du variant et la fonction respiratoire dans la mucoviscidose. Ainsi, le polymorphisme *AGER*-429T/C est associé au Knudson ajusté sur l'âge ($p=0,02$) mais également au score de Kulich ($p=0,03$) et au score KNoRMA ($p=0,03$).

AGER -429T/C is associated with an increased lung disease severity in cystic fibrosis

Running Head:

AGER -429T/C in cystic fibrosis

Authors: Julie Beucher^{1,2,3}, Pierre-Yves Boëlle^{3,4}, Pierre-François Busson⁴, Céline Muselet-Charlier¹, Annick Clement^{1,3} and Harriet Corvol^{1,3} on behalf of the French CF Modifier Gene Study Investigators

Affiliations:

1. AP-HP, Hôpital Trousseau, Pediatric Pulmonary Department; Inserm U938, Paris, France
2. CHU de Rennes, Hôpital Sud, Rennes, France
3. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France
4. AP-HP, Hôpital St Antoine, Biostatistics Department; Inserm UMR-S707, Paris, France

Correspondence should be addressed to:

Harriet Corvol, M.D., PhD.

Hôpital Trousseau, Pediatric Pulmonary Department

26, avenue du Dr Netter; 75012 Paris, France

Phone: (33) 1 71 73 82 90 / Fax: (33) 1 44 73 67 18

e- mail: harriet.corvol@trs.aphp.fr

Abstract

The clinical course of cystic fibrosis (CF) varies between patients bearing identical *CFTR* mutations, suggesting the involvement of modifier genes. We assessed the association of lung disease severity with the variant *AGER* -429 T/C, coding for RAGE, a pro-inflammatory protein, in CF patients from the French CF Gene Modifier Study.

We analyzed the lung function of 967 CF patients *p.Phe508del* homozygous. FEV₁ was analyzed as CF-specific percentile adjusted on age, height and mortality. *AGER* -429T/C polymorphism was genotyped and its function was evaluated *in vitro* by measurement of the luciferase activity.

AGER -429 minor allele (C) was associated with poorer lung function ($p = 0.03$). *In vitro*, the promoter activity was higher in cells transfected with *AGER* -429C compared to cells transfected with the *AGER* -429T allele ($p = 0.016$).

AGER seems to be a modifier gene of lung disease severity in CF, and could be an interesting biomarker of CF airway inflammation. The functional promoter *AGER*-429C variant is associated with an increased RAGE expression that can lead to an increased lung inflammation and a more severe lung disease.

Keywords: cystic fibrosis, lung function, modifier gene, receptor for advanced glycation endproducts

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common severe autosomal recessive genetic disease in Caucasians caused by mutations in the *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene. In patients with CF, lung disease is the major cause of morbidity and mortality. The progressive decline of pulmonary function is due to a vicious cycle of airways infection and inflammation. The inflammatory process in CF lung is dominated by a neutrophilic influx, associated with high concentrations of neutrophil-derived mediators, in particular pro-inflammatory cytokines such as the interleukin (IL)-8 and the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) [1, 2].

RAGE is a member of the cell surface receptor immunoglobulin superfamily. It is a multiligand receptor with a short cytosolic domain and a large extra cellular region containing 3 immunoglobulin-like-domains (V, C1, C2 domains). These domains co-ordinately interact and bind with different ligands, leading to the activation of several proinflammatory signalling pathways [3]. RAGE is expressed in almost all tissues, although the highest levels are found in the respiratory alveolar type I epithelial cells [4, 5]. It is well described that RAGE plays a major role in lung homeostasis [4, 6]. In pulmonary diseases, RAGE has been shown to be either increased or decreased [2, 7, 8]. Increased levels of RAGE have been observed in the alveolar walls of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) compared to controls [8]. In CF, RAGE expression has been shown to be up-regulated in the CF airway neutrophils compared to their blood counterparts [2]. On the opposite, loss of RAGE has been incriminated in idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis [7].

The gene encoding RAGE, *AGER*, is highly polymorphic. Several variants have been described with various functional effects [9, 10]. Interestingly, recent genome-wide association studies (GWAS) conducted in huge European cohorts have shown that one *AGER* variant (rs2070600) was correlated with lung function [11, 12]. Moreover, we and other have previously shown that the common ancestral haplotype 8.1, which contains the promoter variant *AGER* -429T/C (rs1800625), was associated with lung disease severity in European CF patients [13, 14].

Based upon the biologic, genetic and clinical evidence, we hypothesized that the variant *AGER* -429 T/C was involved in the exuberant lung inflammation process in CF, which drives the decline of lung function. To investigate this hypothesis, we first tested whether this variant was associated with lung disease severity in CF patients from the French CF Gene

Modifier Study. In addition, we tested whether this promoter variant was associated with a modulation in RAGE expression.

Results

Clinical characteristics of the CF patients from the French CF Gene Modifier Study and *AGER* -429T/C distribution

The main characteristics of the study population are listed in **Table 1**. As required by the inclusion criteria, the 967 patients were from European origin, *CFTR* p.Phe508del homozygous and pancreatic insufficient. Median age was 19.8 years. The KNoRMA distribution for the entire cohort is shown in **Figure 1** [15]. Minor allele frequency of *AGER*-429 T/C variant was similar to that observed in Caucasians (14.5% vs. 15.5% in Hapmap) and did not show evidence of HWE departure ($p=0.52$).

AGER -429T/C association with lung disease severity

Compared to the patients homozygous for the major allele (*AGER* -429TT), the patients carrying at least one minor allele (*AGER* -429CC and *AGER* -429 CT) had a more severe lung disease severity, manifesting as a significantly lower FEV₁. This association was observed for each FEV₁ analyzes: decrease of the mean FEV₁ percent-predicted (mean difference $-4.4 \pm 1.9\%$, $p=0.02$), lower Kulich CF-specific percentile Z-score (mean difference: -0.17 ± 0.08 , $p=0.03$), and smaller KNoRMA (mean KNoRMA difference: -0.15 ± 0.07 , $p=0.03$).

Effects of *AGER*-429 T/C gene polymorphism on *AGER* promoter activity

To determine if *AGER*-429T/C modulated the activity of *AGER* promoter, constructs containing either *AGER*-429C or *AGER*-429T and a luciferase reporter gene were transfected into BEAS-2B and A549 cells. Luciferase activity, reflecting *AGER* gene promoter activity, was significantly higher in cells containing *AGER*-429C plasmid compared to the cells containing *AGER*-429T plasmid in both cell lines (**Figure 2**; $p=0.016$ in BEAS-2-B cell line and $p=0.031$ in A549 cell line).

Discussion

This study demonstrated that *AGER* could be a modifier gene of lung disease severity in CF. We observed that the promoter *AGER* -429T/C was associated with CF lung disease severity in a large homogeneous cohort of CF patients and was further able to modulate RAGE expression *in vitro*.

We observed an increase in lung disease severity in CF patients carrying at least one *AGER* -429C allele. The patients who contributed to this study constituted a large and homogeneous cohort, thanks to the participation of most of the French CF centers. This study was indeed an ancillary project of a national program on CF modifier genes. So far, more than 3,500 CF patients have been included in this program, that represented around 50% of the French national CF coverage [16]. Only patients from European origin and homozygous for the most frequent *CFTR* p.Phe508del mutation were selected for this study to limit potential biases driven by ancestry and *CFTR* mutations. Moreover, only patients with lung function measurements (older than 6 years) were kept to allow lung disease severity analyses. Nevertheless, almost 1000 CF patients contributed to the study, constituting a large and homogeneous cohort of patients with this rare disease.

One other originality of this study was the several analyzes applied to appreciate lung disease severity in the CF patients. In CF, lung function, and specifically FEV₁, decrease remains the main indicator of lung disease severity. FEV₁ is generally expressed as a percentage of a predicted value based on sex, age, and height in individuals from a healthy reference population [17]. It has been recently recognized that these values were not informative enough for CF [15, 18]. It is indeed obvious that a CF patient with 30% FEV₁ of the reference at age 8 is much more severe than a patient with 30% FEV₁ of the reference at age 30. North-American CF specific reference equations have been proposed, by which the FEV₁ of an individual with CF is compared not to that of a healthy reference population but rather to that of a “typical” CF population [18]. A further modification has been applied to obtain quantitative trait measurements corrected for attrition due to patient mortality with age [15], and usable in genetic association studies [19], namely the KNoRMA. The use of this recently proposed trait quantification procedure allows direct comparison of CF patients, irrespective of age and taking into account mortality. It is therefore an improvement over the previous approaches for comparing lung function.

We previously reported that an ancestral haplotype (8.1 AH), very common in Europeans, was associated with lung function severity in European CF patients [13]. This ancestral haplotype is tagged by several SNPs found near or within genes involved in the inflammatory

1 response, including the presently studied *AGER* -429 T/C polymorphism. However, this
2 difference in severity could have been biased due to pooling CF patients with different *CFTR*
3 genotypes. Our present result, obtained using patients homozygous for the *p.Phe508del*
4 *CFTR* mutation only and all of European origin, limits the effect of such biases and highlights
5 the role of *AGER* gene. Importantly, we found that more severe lung disease was found in
6 those carrying the -429C polymorphism, the variant that tags the ancestral haplotype.
7 Variants in *AGER* gene have been described to modify the lung function in several genome-
8 wide association studies (GWAS) in large European general population cohorts [11, 12]. This
9 would suggest that genes found to modulate lung function in general population studies
10 should be systematically considered and further tested for their effect in CF, or could even be
11 used to prioritize the analysis of GWAS in CF studies.
12
13
14
15
16
17
18
19

20 We further observed that the *AGER* -429T/C variant, located in the gene promoter, was
21 involved in the regulation of RAGE expression. This observation derived from *in vitro*
22 functional assays using bronchial and alveolar epithelial cells. We have shown that *AGER*-
23 429C was associated with an increased promoter activity, which may lead to an increased
24 RAGE expression. This result is concordant with observations of Hudson *et al.* who
25 suggested that the -429C allele upregulated RAGE expression [20]. RAGE triggers the
26 generation of reactive oxygen species and the activation of signal transduction pathways
27 such as NF- κ B, AP-1 and mitogen activated protein kinases (MAPKs), all known to be
28 dysregulated in CF epithelial cells [21, 22]. Consequently, the excess of RAGE, observed in
29 presence of the -429C allele, may be associated with an increased airway inflammation,
30 enhancing the lung disease severity.
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 To conclude, these findings suggest that RAGE could be an interesting biomarker of lung
41 disease severity in CF. The functional promoter -429C variant in the gene encoding RAGE is
42 indeed associated with an increased RAGE expression, that can lead to an increased lung
43 inflammation and, consequently, to a more severe lung disease.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Materials and methods

Ethic statement

The study was approved by the French ethical committee (Comité de Protection des Personnes CPP n°2004/15) and the information collection was approved by the CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés n°04.404).

Study populations

The 49 French CF centers care for an estimated 5,000 to 6,000 CF patients. In 2006, prospective enrollment of prevalent and incident CF patients was initiated by the French CF Gene Modifier Consortium from 38 out of the 49 French CF centers. We selected for *AGER* -429 T/C genotyping 967 CF patients who were over 6 years of age, had both parents born in a European country and were homozygous for the *CFTR* p.Phe508del mutation. Patients, parents or guardians signed an informed consent form for participation in the study as required by French regulations. Phenotypic informations were obtained from hospital records and collected by a single physician, blinded to the results of patients' genotype. This included sex, age, *CFTR* genotype and forced expiratory volume in one seconde (FEV₁) measurements over the last 5 years.

Quantitative phenotype score for lung function in CF patients

A common problem in the comparison of lung disease CF severity between patients is to properly quantify the phenotype. Indeed, FEV₁ percent predicted, a commonly used approach, may mask differences as it is calculated by reference to a normal population [17]. Furthermore, age adjustment remains necessary as no correction is made for patient selection with age due to mortality. Taylor *et al.* recently introduced the KNoRMA, or "Kulich normal residual mortality adjusted", as a quantitative phenotype for use in quantifying CF lung function severity [15]. In short, this approach is based on first determining the age and height adjusted CF specific FEV₁ percentile as in Kulich *et al.* [18], so that each patient is ranked among peers of the same age by a score K between 0 and 100%; and then applying a further correction for attrition due to mortality as $S(a) * K + (1-S(a))$ where S(a) is the % survival of CF patients at age a. KNoRMA is the inverse normal transformation of this quantity, interpreted as a z-value [15].

Genotyping

Genotyping of *AGER* -429T/C (rs1800625) was performed by real time polymerase chain reaction (PCR), using the Step-One-Plus real time PCR (Applied Biosystems, USA) and the conventional Taqman primers and probe (Applied Biosystems, Foster City, USA). Allelic

discrimination was realized by endpoint measurements with specific fluorescent oligonucleotides (detection system software of the ABI prism 7000).

Promoter functional assay

The functional role of -429T/C in the *AGER* gene was tested by the dual luciferase assay. A 500-bp fragment of the *AGER* promoter was prepared in a luciferase reporter construct (switchgear genomics-S722831). Construct with substitution at nucleotide -429 was generated by using the QuikChange site directed mutagenesis kit (Stratagene). Construct was generated by amplifying the *AGER* gene by PCR (forward primer 5'-aaatgattttcttcacgaagctcctcgtg-3' and reverse primer 5'-caggagagaaacgtgttggaagcttcgtgaaagaaatcattt-3'). The constructs were then amplified in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) to obtain high-copy number plasmids. The mutagenesis procedure was controlled by DNA sequencing of the constructs. Human bronchial epithelial cells, BEAS-2B (ATCC, CRL-9609), and adenocarcinomic alveolar basal epithelial cells, A549 (ATCC, CCL-185) cultivated in F-12 Nutrient Mixture with L-glutamine (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum and 100U/mL penicillin G-streptomycin were incubated at 37°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. We seeded 10⁵ cells in each well of 12 plates for 1 day before transfection to obtain 70-80% cells' confluence. The cells were transfected with the *AGER* plasmid (1µg) and internal Renilla luciferase control plasmid (100ng) using lipofectamine as transfection reagent (Invitrogen). Eighteen hours after transfection, cell lysates were prepared with passive lysis buffer (Promega), from the 100-µl lysate, a 20-µl aliquot was assayed for firefly luciferase and Renilla luciferase activity using a Dual-Luciferase Reporter Assay Kit (Promega). The activity of each promoter was directly measured by the ratio of the firefly luciferase level to the Renilla luciferase level. In BEAS-2B and A549 cells, six independent transfection experiments were performed in triplicate.

Statistical Analysis

Conformance of the allele frequencies with the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested using Fisher's exact test. We used linear mixed models of FEV₁ measurements according to age to obtain patient specific smoothed FEV₁ prediction at the current age, thereby fully using the longitudinal data to reduce measurement error. For each patient, the smoothed FEV₁ prediction was transformed to KNoRMA as described in Taylor *et al.* [15]. Association between pulmonary function and genotype was assessed using a linear regression model. We tested the effect of carriage of at least one minor allele (*i.e.* dominant coding). Allele-specific differences in luciferase activity were compared using the Wilcoxon

signed-rank test. All analyses were done using the R software. A P-value of less than 5% was interpreted as evidence of a statistically significant difference or association.

Acknowledgements

French CF Modifier Gene Study Investigators

ABELY,M., American Memorial Hospital, Reims / BASSINET,L., Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil / BELLEGUIC,C., Hôpital Pontchaillou, Rennes / BELLON,G., Hôpital Femme Mère Enfant, Bron / BESSACI,K., American Memorial Hospital, Reims / BONNEL,A.S., Hôpital André Mignot, Le Chesnay / BRÉMONT,F., Hôpital des Enfants de Toulouse, Toulouse / BROUARD,J., Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen / BUI,S., Hôpital Des Enfants Groupe Pellegrin, Bordeaux / CHIRON,R., Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier / CHUMBI-FLORES,R., Hôpital de la Tronche, Grenoble / CLEMENT,A., Hôpital Armand Trousseau, Paris / CORVOL,H., Hôpital Armand Trousseau, Paris / DALPHIN,J.C., CNRS-UFC,UMR 6249 Chrono-environnement, Hôpital Jean Minjoz, Besançon / DALPHIN,M.L., Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon / DAVID,V., Hôpital Mère-Enfant, Nantes / DE MIRANDA,S., Hôpital Foch, Suresnes / DERELLE,J., Hôpital d'Enfants, Vandoeuvre les Nancy / DOMBLIDES,P., Hôpital Haut Lévêque, Pessac / DOMINIQUE,S., Centre Hospitalier Universitaire Charles Nicolle, Rouen / DUBUS,J.C., Hôpital d'Enfants de la Timone, Marseille / DURIEU,I., UCBL1,Groupe Hospitalier Lyon Sud - Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite / DURY,S., Hôpital Maison Blanche, Reims / ELLAFFI,M., Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen / EPAUD,R., Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil / FANTON,A., Hôpital d'Enfants du Bocage, Dijon / FAYON,M., Hôpital Des Enfants Groupe Pellegrin, Bordeaux / FLEURENCE,E., Hôpital d'Enfants, Saint-Denis de la Réunion / FOUCAUD,P., Hôpital André Mignot, Le Chesnay / GINIES,J.L., Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers / GODBERT,B., Hôpital de Brabois, Vandoeuvre les Nancy / GRENET,D., Hôpital Foch, Suresnes / GUILLOT,M., Centre Hospitalier Robert Bisson, Lisieux / HÉRAUD,M. C., Centre Hospitalier Estaing, Clermont-Ferrand / HOUSSET,B., Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil / HUBERT,D., Hôpital Cochin, Paris / HUET,F., Hôpital d'Enfants du Bocage, Dijon / KESSLER,R., Hôpital Civil, Strasbourg / LABBÉ,A., Centre Hospitalier Estaing, Clermont-Ferrand / LAURANS,M., Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen / LE BOURGEOIS,M., Necker Hôpital d'Enfants Malades, Paris / LE ROUX,P., Hôpital Jacques Monod, Montivilliers / LLERENA,C., Hôpital de la Tronche, Grenoble / LOEUILLE,G.A., Centre Hospitalier de Dunkerque, Dunkerque / MARGUET,C., Centre Hospitalier Universitaire Charles Nicolle, Rouen / MELY,L., Hôpital Renée Sabran, Giens / MOISAN-PETIT,V., Centre Hospitalier Bretagne Atlantique, Vannes / MUNCK,A., Hôpital Robert Debré, Paris / MURRIS-ESPIN,M., Hôpital Larrey, Toulouse / NOVE JOSSERAND,R., Groupe Hospitalier Lyon Sud - Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite / PAUTARD,J.C., Hôpital Nord, Amiens / PIN,I., INSERM U823 Université Joseph Fourier,Hôpital de la Tronche, Grenoble / PRAMIL,S., Centre Hospitalier Universitaire Charles Nicolle, Rouen / PREVOTAT,A., Hôpital Calmette, Lille / RAMES,C., Hôpital Nord, Amiens / RAULT,G., Centre de Perharidy, Roscoff / REIX,P., Hôpital Femme Mère Enfant, Bron / REMUS,N., Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Créteil / RENOUIL,M., Groupe Hospitalier Sud Réunion, Saint-Pierre de la Réunion / REYNAUD-GAUBERT,M., Hôpital Nord, Marseille / RICHAUD THIRIEZ,B., Hôpital Jean Minjoz, Besançon / ROUSSEY,M., Université de Rennes 1,Hôpital Sud Annexe Pédiatrique ,Rennes / SERMET-GAUDELUS,I., Necker Hôpital d'Enfants Malades ,Paris / STREMLER,N., Hôpital d'Enfants de la Timone, Marseille / UFFREDI,M.L., Centre Hospitalier Bretagne Atlantique, Vannes / URBAN,T., Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers / VIGNERON,P., Centre Hospitalier Bretagne Sud,

Lorient / WALLAERT,B., Hôpital Calmette, Lille / WEISS,L., Hôpital de Hautepierre, Strasbourg.

Acknowledgements: The authors would like to thank the patients and families who participated in this study and the numerous health care providers and community clinics for their support and participation. We would like to especially thank the computer specialists and the clinical research assistants involved in the study design and patients' recruitment of the French sample, namely: Jean-François Vibert, Malika Mahloul, Delphine Michon, Alexandra Blondel and Pauline Touche.

Funding Sources: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Université Pierre et Marie Curie Paris (UPMC), Agence Nationale de la Recherche (ANR), Direction Générale de la santé (DGS), Association Vaincre La Mucoviscidose, Chancellerie des Universités (Legs Poix), Association Agir Informer Contre la Mucoviscidose (AICM), GIS-Institut des Maladies Rares. JB was supported by Rennes CHU-Hospital and SFP2A fellowship.

Conflict of interest: None of the authors have any commercial or other associations that might pose a conflict of interest.

References

- [1] Corvol H, Fitting C, Chadelat K, Jacquot J, Tabary O, et al. Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Jun;284(6):L997-1003.
- [2] Makam M, Diaz D, Laval J, Gernez Y, Conrad CK, et al. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 7;106(14):5779-83.
- [3] Han SH, Kim YH, Mook-Jung I. RAGE: the beneficial and deleterious effects by diverse mechanisms of actions. *Mol Cells*. 2011 Feb;31(2):91-7.
- [4] Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR. Implication of receptor for advanced glycation end product (RAGE) in pulmonary health and pathophysiology. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Aug 31;162(3):210-5.
- [5] Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, Kojima K, Hata Y, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 May 1;173(9):1008-15.
- [6] Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res*. 2006 Mar;323(3):475-88.
- [7] Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, Tobolewski JM, Tan RJ, et al. A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2008 Mar;172(3):583-91.
- [8] Wu L, Ma L, Nicholson LF, Black PN. Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD. *Respir Med*. 2011 Mar;105(3):329-36.
- [9] Gaens KH, Ferreira I, van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Blaak EE, et al. Association of polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating RAGE levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Dec;94(12):5174-80.
- [10] Kalousova M, Jachymova M, Mestek O, Hodkova M, Kazderova M, et al. Receptor for advanced glycation end products--soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Jul;22(7):2020-6.
- [11] Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, Gharib SA, Loehr LR, et al. Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat Genet*. 2010 Jan;42(1):45-52.
- [12] Repapi E, Sayers I, Wain LV, Burton PR, Johnson T, et al. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat Genet*. 2010 Jan;42(1):36-44.
- [13] Corvol H, Beucher J, Boelle PY, Busson PF, Muselet-Charlier C, et al. Ancestral haplotype 8.1 and lung disease severity in European cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2011 Oct 10.
- [14] Laki J, Laki I, Nemeth K, Ujhelyi R, Bede O, et al. The 8.1 ancestral MHC haplotype is associated with delayed onset of colonization in cystic fibrosis. *Int Immunol*. 2006 Nov;18(11):1585-90.
- [15] Taylor C, Commander CW, Collaco JM, Strug LJ, Li W, et al. A novel lung disease phenotype adjusted for mortality attrition for cystic fibrosis Genetic modifier studies. *Pediatr Pulmonol*. 2011 Sep;46(9):857-69.
- [16] Bellis G, Cazes MH, Lemonnier L, Sponga M. Registre Français de la Mucoviscidose. www.registredelamuco.org. 2010.
- [17] Knudson RJ, Slatin RC, Lebowitz MD, Burrows B. The maximal expiratory flow-volume curve. Normal standards, variability, and effects of age. *Am Rev Respir Dis*. 1976 May;113(5):587-600.
- [18] Kulich M, Rosenfeld M, Campbell J, Kronmal R, Gibson RL, et al. Disease-specific reference equations for lung function in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Oct 1;172(7):885-91.
- [19] Wright FA, Strug LJ, Doshi VK, Commander CW, Blackman SM, et al. Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nat Genet*. 2011 Jun;43(6):539-46.

- [20] Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2001 Jun;50(6):1505-11.
- [21] Vazzana N, Santilli F, Cuccurullo C, Davi G. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Intern Emerg Med*. 2009 Oct;4(5):389-401.
- [22] Saadane A, Eastman J, Berger M, Bonfield TL. Parthenolide inhibits ERK and AP-1 which are dysregulated and contribute to excessive IL-8 expression and secretion in cystic fibrosis cells. *J Inflamm (Lond)*. 2011;8:26.

Figure 1. FEV₁ survival adjusted CF specific percentiles (KNoRMA) distribution in CF subjects (n=967).

Distribution of the lung function according to the FEV₁ adjusted on the age, the height and the mortality; expressed in KNoRMA in the entire cohort.

Figure 2. *In vitro* influence of *AGER*-429T/C polymorphism on the promoter activity

Constructs containing either *AGER*-429C or *AGER*-429T and a luciferase reporter gene were transfected into BEAS-2B cells. Luciferase activity assays were performed in triplicate in six independent experiments. Relative luciferase activity is represented as a ratio against the luciferase activity in cells transfected with the *AGER*-429T plasmid. Luciferase activity, reflecting activity of the *AGER* gene promoter, was significantly higher in cells containing *AGER*-429C plasmid compared to the cells containing *AGER*-429T plasmid (p=0.016)

Study population, n	967
Characteristics	
Current age: median [range]	19.8 [6.1 - 55.6]
Gender (% female)	48 %
<i>p.Phe508del</i> homozygous, n (%)	967 (100%)
Pancreatic insufficiency, n (%)	967 (100 %)
BMI z-score, median [range]	-0.76 [-6.14 - 2.08]
FEV ₁ , % predicted, median [range]	62.7 [2.8 - 208]
Kulich, Z-score predicted, median [range]	-0.07 [-2.33 - 2.33]
KNoRMA, Z-score predicted, median [range]	0.3 [-1.79 - 3.21]
<i>AGER</i> -429T/C	
<i>AGER</i> -429 C carriers (MAF)	14.5%
HWE (p-value)	0.52

Table 1. Clinical characteristics of the CF subjects from the French CF Gene Modifier Study and *AGER* -429T/C distribution. BMI: body mass index, FEV₁: forced expired volume in 1 second, MAF: minor allele frequency, HWE: Hardy Weinberg Equilibrium

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

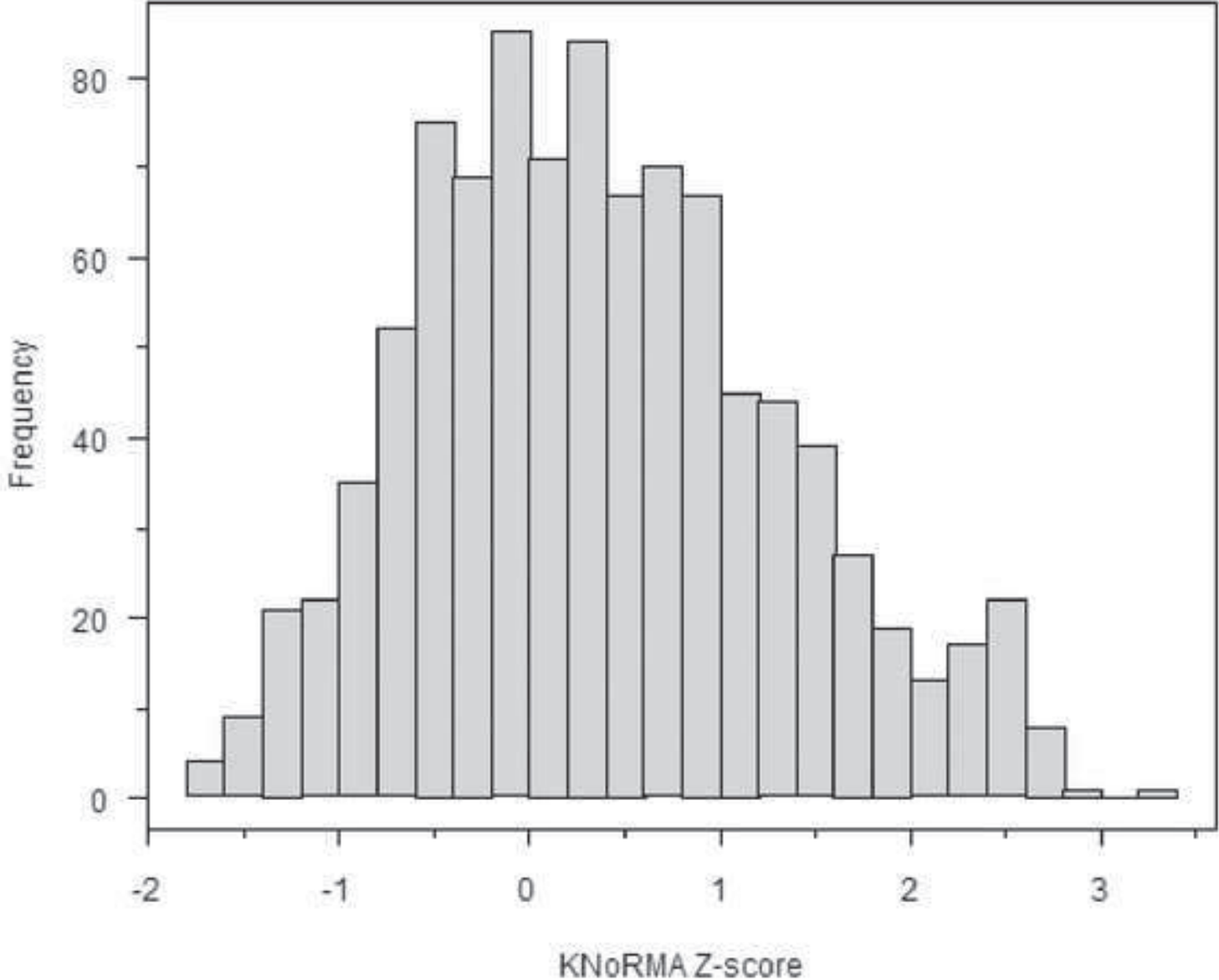
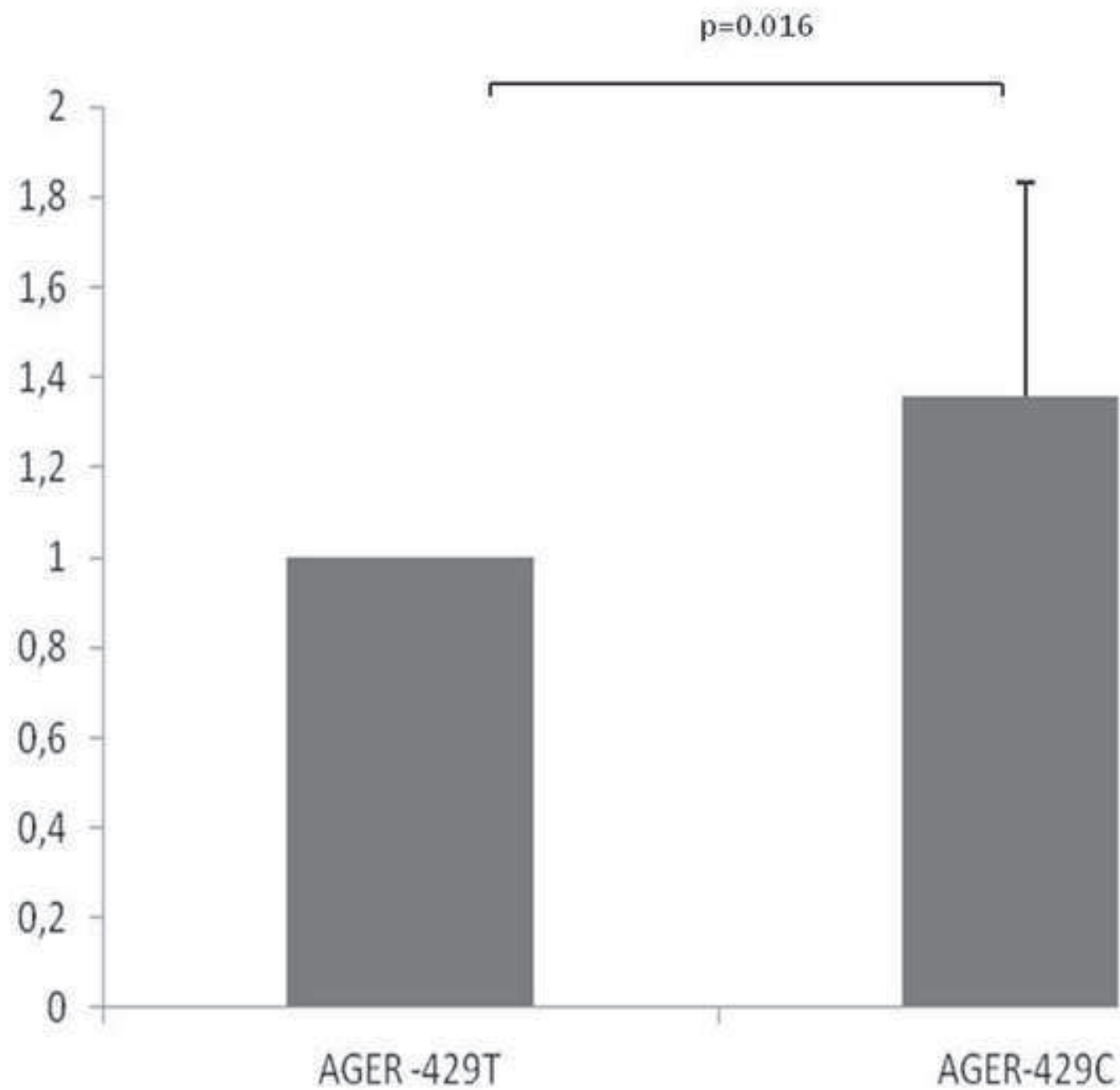


Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)



4.2. Résultats complémentaires sur RAGE

4.2.1. Génotypage de *AGER*

Le polymorphisme *AGER* -429T/C a également été étudié à titre individuel dans la cohorte de patients sévères non homozygotes F508del. Dans cette population de 145 patients, on retrouve uniquement une association avec le KNoRMA ($p=0,034$). Des analyses complémentaires seront réalisées après enrichissement de la cohorte.

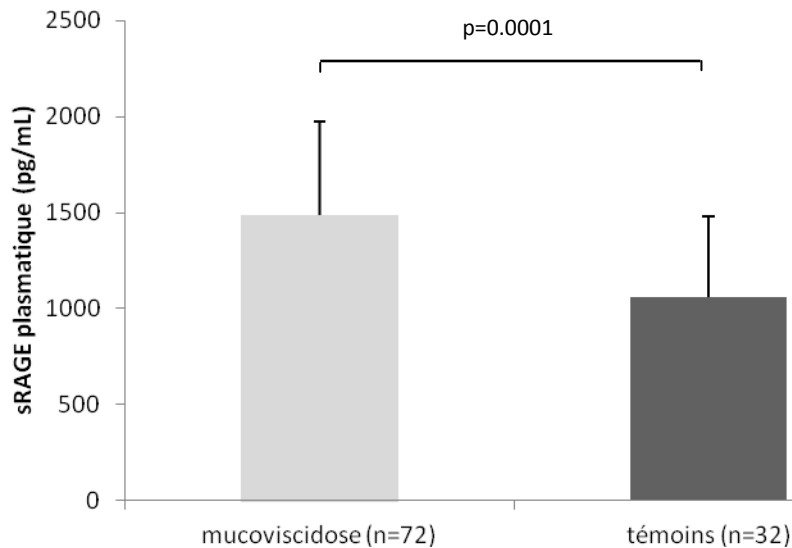
4.2.2. Dosage plasmatique de sRAGE et étude génotype/phénotype

RAGE peut être clivé par des MMPs et la forme soluble sRAGE se retrouve libérée dans la circulation générale. Des dosages plasmatiques de la forme soluble sRAGE peuvent être réalisés par ELISA. Ainsi, nous avons dosé sRAGE chez 72 patients et 32 témoins sains (Tableau 7). Lors du dosage, les patients atteints de mucoviscidose étaient tous à l'état stable, sans exacerbation respiratoire à l'examen clinique, ni signe biologique d'inflammation (C-reactive protéine ou CRP < 10). La majorité des patients était insuffisant pancréatique (89%) et la moyenne d'âge était significativement plus basse que celle de la population témoin.

	Mucoviscidose	Témoins	P
Population d'étude, n	72	32	
Age, médiane [rang]	11.4 [1-20.5]	27 [22, 62]	0,0001
Sexe, femme (%)	50%	72%	0,06
génotype <i>CFTR</i> , %			
F508del homozygote	42%		
F508del hétérozygote	44%		
Autres mutations	14%		
C reactive protéine, médiane	1 [1-10]	Non dose	

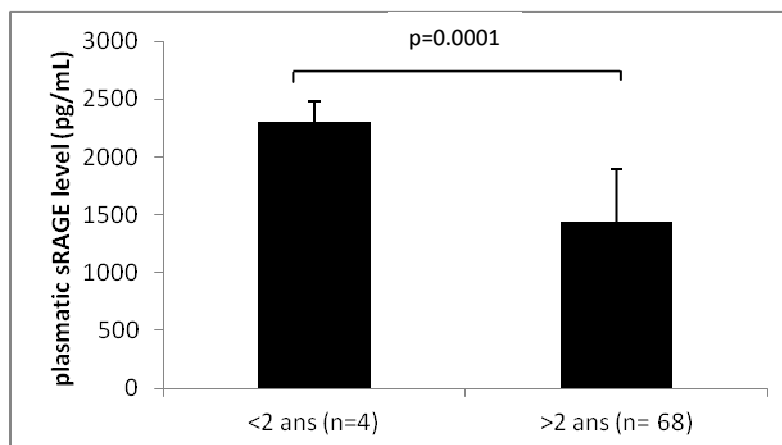
Tableau 7 Données épidémiologiques de la population de témoins et de patients atteints de mucoviscidose ayant eu un dosage de sRAGE

Les patients atteints de la mucoviscidose ont des taux plasmatiques de sRAGE significativement plus élevés à ceux des sujets sains (Figure 23 ; $p=0,0001$). Néanmoins, on ne retrouve pas de corrélation entre ces taux et la gravité de l'atteinte pulmonaire, ni avec le variant *AGER* -429T/C.



[Figure 23 Comparaison des taux plasmatiques de sRAGE chez des sujets sains volontaires et des patients atteints de mucoviscidose](#)

On remarque l'existence de variations des taux de sRAGE en fonction de l'âge chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, les enfants de moins de 2 ans ont des taux significativement supérieurs ($p= 0,0001$; [Figure 24](#)) ; après l'âge de 2 ans, il n'y a plus de variation en fonction de l'âge. Les taux élevés de sRAGE avant l'âge de 2 ans restent à confirmer du fait du faible nombre d'enfant de moins de 2 ans ($n=4$). De plus, la différence entre les sujets sains et les patients reste significative lorsque l'on élimine les sujets de moins de 2 ans ($p< 0,0002$).

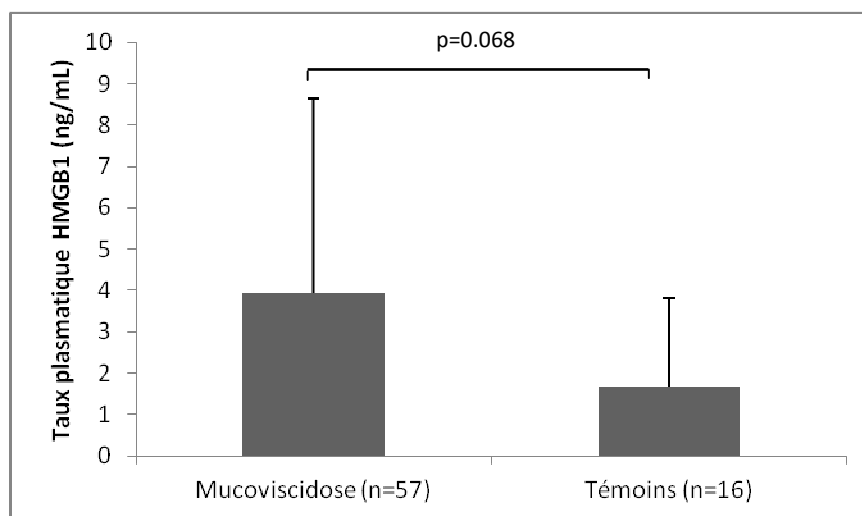


[Figure 24 Répartition des taux plasmatiques de sRAGE selon l'âge chez les patients atteints de mucoviscidose](#)

Des données phénotypiques supplémentaires ont été recueillies pour les 72 enfants qui ont eu des dosages plasmatiques. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre les taux plasmatiques et la présence d'un diabète, la PaO₂ ou les taux d'immunoglobulines G, A et M. De même, au niveau infectieux, aucune relation n'a été mise en évidence entre les taux plasmatiques de sRAGE et la présence d'une colonisation au *P. aeruginosa* ou au *S. aureus*.

4.2.3. Etude HMGB1

Les taux plasmatiques de HMGB1 ont été mesurés chez seulement 57 patients atteints de mucoviscidose et 16 contrôles, par manque d'échantillons plasmatiques supplémentaires. Les taux plasmatiques chez les patients atteints de mucoviscidose étaient sensiblement plus élevés que ceux observés chez les témoins (résultats proches de la significativité, [Figure 25](#); $p=0,068$). Aucune corrélation n'a été observée entre les taux de sRAGE et de HMGB1, ni entre les taux d'HMGB1 et la fonction pulmonaire. Les faibles échantillons de patients et de témoins peuvent expliquer l'absence de significativité des résultats.



[Figure 25 Taux plasmatiques de HMGB1 chez des patients atteints de mucoviscidose et des sujets sains](#)

4.3. Discussion

Cette étude démontre que *AGER* pourrait être un gène modificateur de la sévérité de l'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose. Nous avons en effet montré que le variant *AGER* -429T/C, situé au niveau du promoteur, module *in vitro* l'expression de la protéine et est associé à une plus grande sévérité de l'atteinte respiratoire chez des patients F508del homozygotes. Des résultats similaires sont observés dans la cohorte de patients sévères

non homozygotes F508del. De plus, les taux de sRAGE, la forme soluble du récepteur, sont plus élevés chez des patients atteints de mucoviscidose par rapport aux témoins sains.

Cette étude montre que ce variant est impliqué dans la régulation de l'expression de la protéine RAGE. En effet, par des études fonctionnelles réalisées *in vitro* dans des lignées cellulaires alvéolaires et bronchiques, nous montrons que le variant *AGER* -429C est associé à une augmentation de l'activité du promoteur et donc à une augmentation de l'expression de RAGE. Ces résultats sont concordants avec ceux de Hudson et al. réalisés précédemment dans une autre lignée cellulaire et avec un autre agent transfectant (Hudson et al. 2001). RAGE conduit à l'activation des voies de signalisation NF- κ B et MAPK, ainsi qu'à la génération de dérivés réactifs de l'oxygène, tous connus pour être dérégulés dans la mucoviscidose (Muselet-Charlier et al. 2007; Vij et al. 2009; Saadane et al. 2011). De ce fait, l'excès de RAGE observé en présence de l'allèle -429C peut être associé à une inflammation accrue des voies aériennes et une plus grande sévérité de l'atteinte pulmonaire.

Nous observons de plus une sévérité accrue de l'atteinte pulmonaire chez les individus porteurs d'au moins un allèle *AGER* -429C dans une cohorte de patients homozygotes F508del. Ce variant est un des composants de l'haplotype AH8.1, que nous avons évoqué comme modificateur de l'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose (Corvol et al. 2011). Ces résultats que nous avons rapportés dans une cohorte de patients porteurs de tous types de mutations, n'ont pour le moment pas été répliqués (travail en cours, voir ci-dessus). Il se pourrait donc que ce variant soit un gène modificateur indépendamment de l'haplotype AH8.1.

AGER a été impliqué dans de larges études de GWAS en tant que modificateur de la fonction pulmonaire chez des sujets sains (Hancock et al. 2010; Repapi et al. 2010). Dans la mucoviscidose, on aurait pu supposer que cet effet risquait d'être masqué par la sévérité intrinsèque de la maladie. Ces données suggèrent que les gènes mis en évidence dans les études de GWAS dans des populations saines comme modulant l'atteinte respiratoire devraient systématiquement être étudiés dans la mucoviscidose, ou, au moins, être utilisés pour prioriser les analyses de GWAS dans la mucoviscidose.

Nous observons que les taux plasmatiques de sRAGE sont augmentés dans la mucoviscidose par rapport à des témoins. L'inflammation des voies aériennes est un facteur clé dans l'atteinte respiratoire de la mucoviscidose où il existe un déséquilibre de la balance anti- et pro-inflammatoire. sRAGE est considérée comme une protéine anti-inflammatoire, jouant un rôle de récepteur leurre (Raucci et al. 2008). En condition aiguë d'inflammation,

telle que le SDRA, les taux de sRAGE sont augmentés et corrélés à la sévérité des lésions pulmonaires (Calfee et al. 2008; Mauri et al. 2010; Nakamura et al. 2011). D'un autre côté, des taux circulants diminués de sRAGE ont été observés dans la BPCO et dans la fibrose pulmonaire (Ohlmeier et al. 2010; Smith et al. 2011; Sukkar et al. 2011). Dans la mucoviscidose, Makam et al. ont également décrit des taux plasmatiques de sRAGE plus élevés que les taux pulmonaires (Makam et al. 2009). Ils ont mesuré les taux de sRAGE dans le plasma de patients atteints de mucoviscidose, les taux obtenus étaient comparables aux nôtres. Les métalloprotéases étant augmentées dans la mucoviscidose, on peut supposer que cet excès pourrait accroître le clivage de sRAGE avec, en conséquence, une majoration des taux plasmatiques (Zhang et al. 2008; Jackson et al. 2010). Comme nous le verrons ci-dessous, l'augmentation des taux de sRAGE est corrélée à celle des taux de TNF- α (Figure 29), ce qui est faveur de l'implication de sRAGE dans l'inflammation sans que cela ne préjuge de son rôle pro- ou anti-inflammatoire.

Nous avons également montré que les taux plasmatiques de sRAGE sont plus élevés chez les enfants de moins de 2 ans. Ces résultats restent à confirmer du fait du faible nombre d'enfants inclus. Néanmoins, on pourrait supposer que ces résultats soient liés à l'implication de RAGE dans la croissance alvéolaire. Aucune étude n'a été réalisée sur la cinétique de RAGE et sRAGE en fonction de l'âge. Néanmoins, dans l'étude de Boor et al. qui comparent les taux de sRAGE chez des mères et leurs enfants, on remarque que les nourrissons ont toujours des taux plus élevés que ceux de leur mère (Boor et al. 2010). Une étude chez la souris a consisté à comparer des souris knock out (KO) pour RAGE à des souris sauvages et des souris surexprimant RAGE. Dans ce cas, les souris KO ne présentent pas d'anomalie de la morphogénèse ; ce qui suggèrent la présence d'autres récepteurs qui compensent l'absence de RAGE. Au contraire, dans le modèle de souris surexprimant RAGE, les souris présentaient une hypoplasie sévère (Reynolds et al. 2011). Ils concluent donc à la nécessité d'une régulation fine de RAGE dans la croissance pulmonaire. Une étude parallèle des taux de RAGE et sRAGE sembleraient intéressantes pour préciser leur implication dans la croissance pulmonaire.

Dans notre étude, nous retrouvons une augmentation de HMGB1, ligand de RAGE, par rapport à des témoins, même si cette différence n'atteint pas la significativité. La petite taille de notre échantillon peut expliquer cette absence de significativité. Des études antérieures sur l'activité de HMGB1 s'étaient intéressées à son implication dans des pathologies respiratoires. Dans la BPCO et l'asthme, les niveaux de HMGB1 plasmatiques et dans les ECBC étaient plus élevés que chez des contrôles et corrélés à la sévérité de la maladie (Hou et al.; Watanabe et al.). Les taux de HMGB1 dans les expectorations sont corrélés

positivement aux taux plasmatiques dans l'asthme mais pas dans la BPCO (Hou et al.). HMGB1 est également élevé dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose par rapport à des témoins sains (Rowe et al. 2008). De plus, les concentrations de HMGB1 sont corrélées avec les taux sanguins de neutrophiles et HMGB1 induit l'activité chimotactique des neutrophiles.

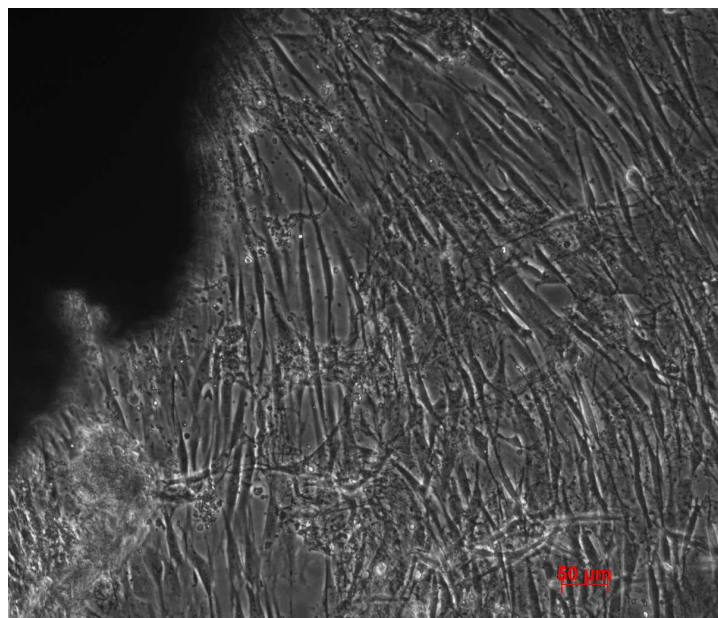
5. Etude du polymorphisme de *HSP 1267A/G*

5.1. Génotypage du polymorphisme

Dans notre cohorte de patients homozygotes pour la mutation F508del, nous n'avons pas retrouvé d'association entre le polymorphisme *HSP1267A/G* et la pente de déclin du VEMS. Au contraire, dans la population de patients sévères non homozygotes F508del, le polymorphisme est associé aux scores de Kulich ($p=0,04$) et au KNoRMA ($p=0,036$). Cet effet est d'autant plus important dans la sous-population de femmes (Kulich $p=0,013$ et KNoRMA $p<0,01$).

5.2. Etude fonctionnelle du polymorphisme

Les fibroblastes issus de derme de 6 sujets sains ont été mis en culture et trypsinés au bout de 5-6 semaines lorsque les flasques étaient à confluence ([Figure 26](#)).



[Figure 26 Culture de fibroblastes à partir d'explants dermiques](#)

5.2.1. Génomage de l'haplotype ancestral AH8.1

Une fois à confluence, l'ADN des six échantillons a pu être recueilli à l'aide du QIAamp® DNA mini kit (Quiagen) et génotypé pour les 4 polymorphismes composant l'haplotype. Les résultats étaient les suivants:

SNP Patient	<i>HSP</i>	<i>LTA</i>	<i>TNF</i>	<i>AGER</i>
Patient 1	GG	AG	GG	TT
Patient 2	AA	AA	GG	TT
Patient 3	AG	AA	GG	TT
Patient 4	AG	AG	GG	TT
Patient 5	GG	AA	GG	TT
Patient 6	AG	AA	GG	TT

[Tableau 8 Génomage de l'haplotype AH8.1 à partir des fibroblastes de 6 patients](#)

Seuls les patients 2, 5 et 6 ont été analysés par la suite car ils variaient uniquement pour le polymorphisme *HSP* 1267A/G ([Tableau 8](#)). Le patient 3 n'a pas pu être pris en compte du fait d'une prolifération cellulaire lente, et d'un nombre insuffisant de réplication à ce jour.

5.2.2. Recueil d'ARN et PCR semi quantitative

Afin d'étudier l'impact du variant sur la quantité et la stabilité du transcrit de HSP70, nous avons comparé les taux d'ARNm entre les fibroblastes de patients porteurs ou non du polymorphisme. Nous avons extrait l'ARNm des fibroblastes en présence ou non de l'inhibiteur de transcription (Actinomycine D), utilisé pour bloquer la transcription et étudier la stabilité de l'ARNm. Les taux d'ARN, évalués par PCR semi-quantitative, ont été comparés entre les 3 patients pour évaluer l'impact du variant puis entre les 3 patients en présence d'actinomycine D pour rechercher une différence de stabilité de l'ARNm. Les PCR semi-quantitatives étaient réalisées en triplicat et les échantillons recueillis à partir de 4 passages différents de cellules. On ne retrouve pas de différence significative entre les taux de base d'ARNm des 3 patients, ni entre les taux de transcrits en présence d'actinomycine D ([Figure 27](#)).

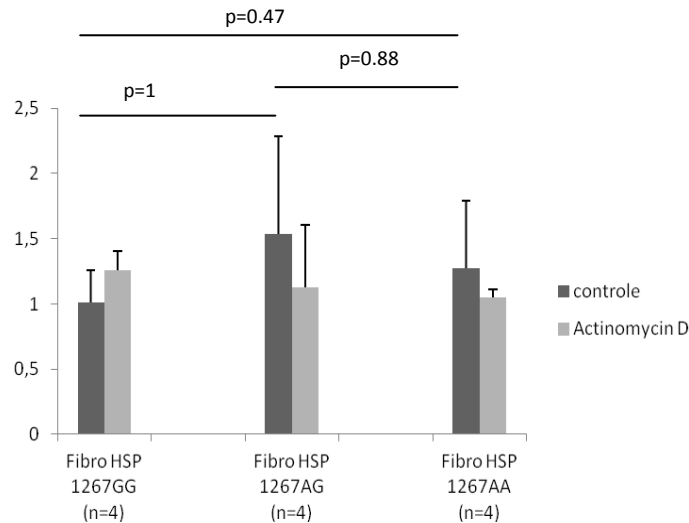


Figure 27 Comparaison des taux d'ARNm mesuré dans les fibroblastes, en fonction de leur génotype et en présence ou non d'actinomycine D

5.3. Discussion

Nous retrouvons une association entre le polymorphisme HSPA1B 1267A/G et les scores de Kulich et de KNoRMA uniquement dans la population de patients sévères non F508del et de façon prépondérante chez les femmes. Sur le plan fonctionnel, on ne retrouve pas d'association entre le variant et les taux de transcrits, ni avec la stabilité du transcrit. Ces résultats sont concordants avec ceux précédemment décrits. Bien que ce variant ait été impliqué en tant que gène modificateur dans différentes pathologies (Favatier et al. 1997; Waterer et al. 2003; Gombos et al. 2008), il n'a pas été retrouvé d'association avec les taux d'ARNm (Schroeder et al. 2000; Temple et al. 2004). Cependant, la présence de l'allèle A, en déséquilibre de liaison avec l'allèle C du variant *HSPA1B* -179T/C, a été associé à une diminution de production d'ARNm HSPA1B (Temple et al. 2004), ainsi qu'à une diminution de la protéine HSP70 (Kee et al. 2008).

Dans notre étude, nous n'avons pas recherché la présence d'autres variants de HSP qui pourraient influencer les résultats. De plus, les expériences *ex-vivo* ont été réalisées sur seulement 4 passages et chez un seul patient dans chaque groupe, tous de sexe masculin. Il semblerait donc intéressant de poursuivre cette étude sur une plus large cohorte, avec un sexe ratio équitable et de réaliser des travaux similaires chez des patients atteints de mucoviscidose.

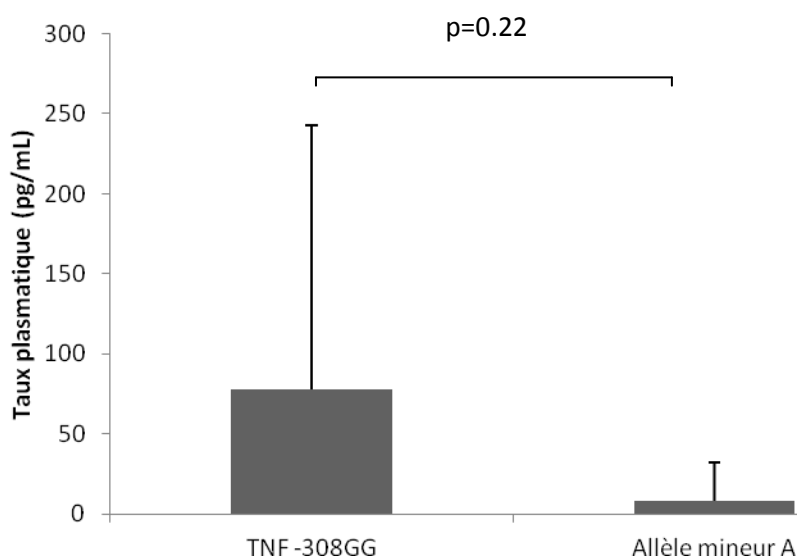
6. Etude du polymorphisme *TNF* -308G/A

6.1. Génotypage du polymorphisme

Des études du polymorphisme *TNF* -308G/A ont déjà été conduites dans de nombreuses pathologies, y compris au niveau pulmonaire où les individus hétérozygotes auraient un risque plus faible de développer une bronchite chronique obstructive ou un cancer pulmonaire (Stankovic et al. 2009). Des études de fonctionnalité ont été réalisées, recherchant un lien entre ce polymorphisme et la production de la protéine (Kaijzel et al. 2001). Plus particulièrement dans la mucoviscidose, ce SNP *TNF* -308G/A a été étudié *ex vivo*, associé non significativement à une augmentation des taux de *TNF*- α (Schmitt-Grohe et al. 2006). Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence d'association entre la présence de ce polymorphisme et la fonction respiratoire dans les 2 populations de patients atteints de mucoviscidose (F508del homozygote et sévère non F508del homozygote).

6.2. Dosages plasmatiques

Nous avons également réalisé des dosages par ELISA de cette protéine. En présence de l'allèle mineur *TNF* -308A, les taux de *TNF*- α sont inférieurs (77,5 pg/mL vs 8,5 pg/mL) mais sans que cette différence ne soit statistiquement significative ($P=0,22$, [Figure 28](#)). De plus, nous n'avons pas trouvé d'association avec l'haplotype 8.1AH ou la sévérité clinique.



[Figure 28](#) Dosages plasmatique du *TNF*- α chez 46 enfants en fonction de la présence du polymorphisme *TNF* -308A/G

Comme nous l'avons évoqué précédemment (page 88), il existe une corrélation positive entre les taux de *TNF*- α et de sRAGE ([Figure 29](#), $p=0,01$).

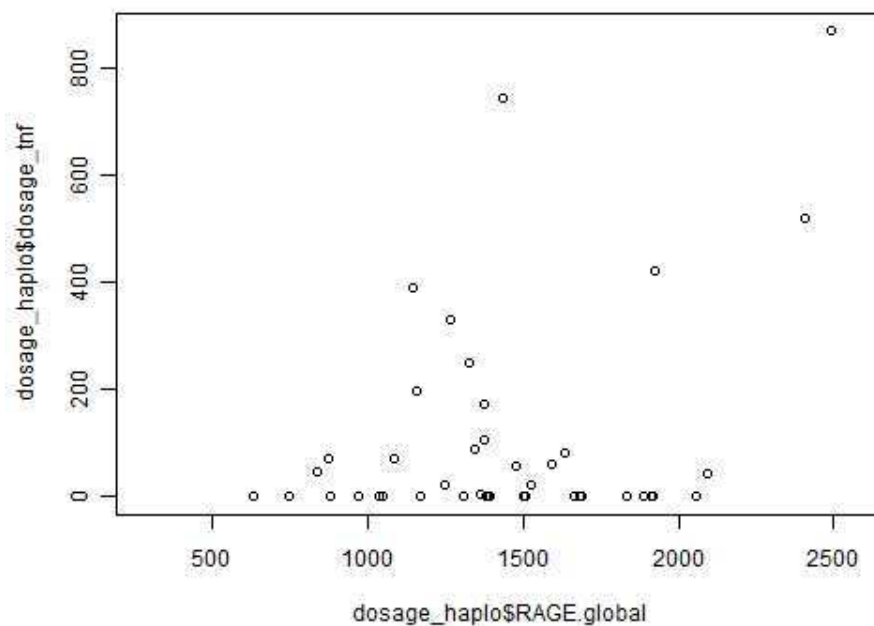


Figure 29 Corrélation des taux plasmatiques de sRAGE et de TNF- α dans la mucoviscidose ($p=0,01$)

6.3. Discussion

AU total, nous n'avons pas retrouvé d'association entre la présence du variant *TNF* -308G/A et la fonction pulmonaire, ni dans la population F508del homozygotes, ni dans la cohorte de patients sévères non F508del homozygotes. De plus, nous n'avons pas trouvé non plus d'association entre les taux de TNF- α et ce polymorphisme. Il est difficile de tirer des conclusions car les taux ont été obtenus dans un faible nombre de patients surtout pour le groupe de patients porteurs de l'allèle mineur ($n=8$). Néanmoins, ces résultats sont concordants avec ceux de la méta-analyse réalisée chez des sujets et qui ne retrouve pas d'association entre ce variant et les taux circulants de TNF- α (Mekinian et al. 2011).

Comme nous l'avons évoqué ci-dessus, l'augmentation des taux de sRAGE est corrélée à celle des taux de TNF- α (Figure 29). Ce résultat n'est pas surprenant dans cette pathologie où il existe une inflammation exacerbée et incontrôlée. Il serait intéressant de rechercher si on trouve cette même association au niveau pulmonaire dans des ECBC.

7. Etude du polymorphisme *LTA* +252A/G

7.1. Génotypage du polymorphisme

Le variant génétique *LTA* 252A/G est situé au niveau d'un intron. Dans notre cohorte de patients homozygotes pour la mutation F508del, nous n'avons pas retrouvé d'association entre le polymorphisme *LTA* 252A/G et la pente de déclin du VEMS. Au contraire, dans la population de patients sévères non homozygotes F508del, le polymorphisme est associé aux scores de Kulich ($p=0,03$) et au KNoRMA ($p=0,013$).

7.2. Etudes fonctionnelles du polymorphisme

7.2.1. Dosages plasmatiques

Nous avons également réalisé des dosages ELISA dans le plasma, les taux sont très faibles, voire indosables et nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre les taux de *LTA* et la sévérité clinique ou le polymorphisme.

7.2.2. Analyses bioinformatiques

Nous avons recherché à l'aide d'un logiciel spécialisé des modifications du site d'épissage en présence du polymorphisme. Ces recherches en bioinformatique ont été réalisées en collaboration avec Abdel Aissat (unité INSERM U955, "Génétique moléculaire & Développement").

Pour cela, nous avons identifié la séquence à l'aide du site Ensembl Genome Browser. Ce site permet d'identifier la séquence de transcrit consensus qui code la protéine officielle, indiquée par la présence d'un numéro Consensus CDS ou « CCDS ». Il existe 2 formes de transcrit avec une taille de l'intron 1 variable (431 ou 287 paires de base). Une fois la séquence complète avec exon et intron récupérée, nous avons identifié le polymorphisme 252A/G, situé entre les exons 1 et 2 :

```
CCAGGGGCTCCGCACAGCAGGTGAGGCTCTCTGCCCCATCTCCTTGGGCTGCCCGTGCTTCGTGCTTTGGACT
ACCGCCCAGCAGTGTCTGCCCCTCTGCCTGGGCCTCGGTCCCTCCTGCACCTGCTGCCTGGATCCCCGGCCTGC
CTGGGCCTGGGCCTTG GTGGGTTTGGTTTGGTTTCCTTCTCTGTCTCTGACTCTCCATCTGTCACTCTCATTGTC
TCTGTACACATTCTCTGTTTCTGCCATG[A/G]TTCCTCTCTGTTCCCTTCTGTCTCTCTGTCTCCCTCTGCTC
ACCTGGGGTTTCTCTGACTGCATCTTGTCCCCTCTCTGTGATCTCTCTCTCGGGGGTGGGGGGTGCTCTCT
CCCAGGGCGGGAGGTCTGTCTTCCGCCGCGTGCCCCGCCCCGCTCACTGTCTCTCTCTCTCTCTTTCTCTG
CAGGTTCTCCCCATGACACCACCTGAACGTCTCTTCTCCCAAGGGTGTGTGGCACCACCCT
```

Intron ; exon.

La séquence est ensuite analysée à l'aide du site « Human Splicing Finder » (<http://www.umd.be/HSF/>), sans, puis avec le polymorphisme afin d'étudier les différences observées sur les sites silencer et enhancer pour chacun des 2 transcrits.

Il n'apparaît pas de sites donneurs ou accepteurs en présence du polymorphisme (Figure 30).

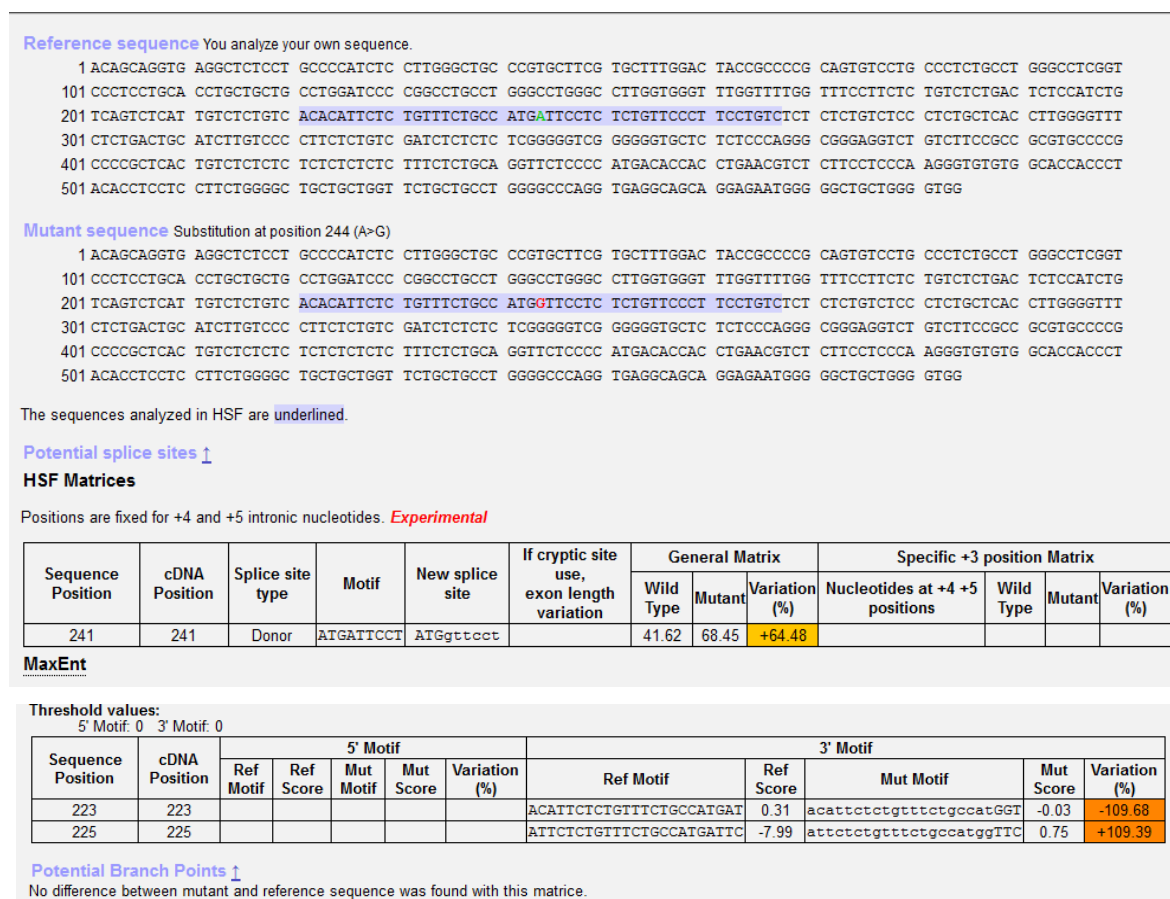


Figure 30 Recherche de site d'épissage à l'aide du site Human Splicing Finder

Les scores sont trop faibles après mutation pour que ces sites soient retenus.

Nous avons ensuite étudié les sites potentiels silenciers, favorables pour épisser un intron.

Silencer motifs ↑

Silencer motifs from Sironi et al.

No difference between mutant and reference sequence was found with this matrice.

ESS decamers from Wang et al.

No Silencer motif found with this matrice

Fas-ESS hexamers

Sequence Position	cDNA Position	Reference sequence	Set	Mutant sequence	Set	Variation
244	244			GTCCT	2, 3	New Site

Predicted PESS Octamers from Zhang & Chasin (Old Dataset)

No Silencer motif found with this matrice

Predicted PESS Octamers from Zhang & Chasin (New Dataset)

No Silencer motif found with this matrice

IEs from Zhang et al.

Sequence Position	cDNA Position	Silencer motif reference sequence	Silencer motif mutant sequence	Variation
241	241	ATGATT	ATGGTT	
242	242		TGGTC	New Site
244	244		GTCCT	New Site

hnRNP motifs - *Experimental*

No Silencer motif found with this matrice

Other splicing motifs ↑

Exonic Splicing Regulatory Sequences from Goren et al.

No difference between mutant and reference was found with this matrice.

Figure 31 Apparition de nouveau site silencer en présence du variant

Le polymorphisme crée des sites potentiels silenciers, ce qui est bénéfique dans l'élimination de l'intron (Figure 31).

Enfin, le polymorphisme détruit des sites enhancers, ce qui là encore favorise l'épissage de l'intron (Figure 32).

Enhancer motifs ↑

ESE Finder matrices for SRp40, SC35, SF2/ASF and SRp55 proteins

Threshold values:

SF2/ASF: 72.98 SF2/ASF (IgM-BRCA1): 70.51 SRp40: 78.08 SC35: 75.05 SRp55: 73.86

Variation expresses the difference between reference and mutant values. Wild Type value is taken as reference.

Sequence Position	cDNA Position	Linked SR protein	Reference Motif (value 0-100)	Linked SR protein	Mutant Motif (value 0-100)	Variation
243	243	SC35	GATTCCTC (78.98)	SC35	GGTCCTC (81.19)	+2.8 %

RESCUE ESE hexamers

No Enhancer motif found with this matrice

Predicted PESE Octamers from Zhang & Chasin (Old Dataset)

Sequence Position	cDNA Position	Reference motif	Motif value (0-100) reference sequence	Mutant motif	Motif value (0-100) mutant sequence	Variation
243	243	GATTCCTC	31.38			Site broken -100

Predicted PESE Octamers from Zhang & Chasin (New Dataset)

Sequence Position	cDNA Position	Reference motif	Motif value (0-100) reference sequence	Mutant motif	Motif value (0-100) mutant sequence	Variation
243	243	GATTCCTC	29.61			Site broken -100

EIEs from Zhang et al.

No difference between mutant and reference sequence was found with this matrice.

ESE motifs from HSF - *Experimental*

Threshold values:

Tra2: 75.964 9G8: 59.245

Variation expresses the difference between reference and mutant values. Wild Type value is taken as reference.

Sequence Position	cDNA Position	Linked ESE protein	Reference Motif (value 0-100)	Linked ESE protein	Mutant Motif (value 0-100)	Variation
240	240	9G8	CATGAT (63.36)			Site broken -100

Figure 32 Disparition de site enhancer en présence du variant

Au total, il semble que ce variant ne modifie pas l'épissage et n'ait donc pas de répercussion sur la protéine. Néanmoins, ce variant est situé dans un intron d'un gène qui a un premier exon non-codant et dont il existe 2 formes de transcrit. Ce variant pourrait affecter la transcription de l'ARN et modifier la proportion de chacune des 2 formes. Si le retentissement de ce polymorphisme sur la fonction respiratoire est confirmé sur une plus grande cohorte, il pourrait être intéressant de quantifier chacune des 2 formes d'ARNm à la recherche d'une modification de répartition.

Les études de fonctionnalité n'ont pas été poursuivies à ce jour pour ce variant.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La mucoviscidose est caractérisée par une importante variabilité phénotypique due en partie à l'influence de gènes modificateurs seuls ou regroupés en haplotype. L'atteinte respiratoire reste la principale cause de morbi-mortalité de cette maladie. La sévérité de l'atteinte respiratoire est essentiellement estimée par la pente de déclin de la fonction respiratoire. Dans les CRCM, les patients ont des mesures pluriannuelles de la fonction respiratoire, et, en particulier de leur VEMS. Ces mesures permettent au clinicien de suivre l'évolution d'un patient mais également de le comparer aux autres patients afin d'apprécier la sévérité de sa maladie respiratoire. Jusqu'alors, les VEMS étaient exprimés en pourcentage des valeurs attendues pour l'âge et la taille des patients. Ces pourcentages dérivent d'équation mises au point il y a plusieurs décennies dans des groupes de sujets sains de différentes ethnies par Knudson et al. puis Hankinson et al (Knudson et al. 1976, Hankinson et al. 1999). Plus récemment, il est apparu indispensable de pouvoir estimer la sévérité des patients atteints de mucoviscidose non pas par rapport à des sujets sains, mais, au contraire par rapport à d'autres patients. Ces mesures permettent ainsi de « classer » des patients sur une échelle de percentiles (Kulich et al. 2005). De façon tout à fait intéressante et même si ceci était pressenti par les médecins suivant régulièrement les patients, les percentiles varient peu avec le temps, ce qui signifie qu'un patient a très souvent une atteinte respiratoire d'emblée « sévère » ou, au contraire « modérée ». Les thérapeutiques permettent bien sûr de ralentir le déclin de la fonction respiratoire mais de façon similaire pour un même groupe de patients. Ces nouvelles mesures ont récemment été enrichies par une correction en fonction de la survie des patients et ont été baptisées score KNoRMA (Taylor et al. 2011). L'utilisation de ce score pour mesurer la sévérité de l'atteinte respiratoire dans la mucoviscidose est encore peu répandue, et constitue une des originalités de ce travail.

Haplotype ancestral AH8.1

Dans la première partie, nous avons cherché à déterminer l'impact de l'haplotype AH8.1 sur le phénotype respiratoire dans la mucoviscidose. L'étude préliminaire que nous avons réalisée, a consisté à analyser l'haplotype ancestral AH8.1 dans une cohorte européenne de patients atteints de mucoviscidose. Nous avons observé que l'haplotype AH8.1 accélérerait la pente de déclin du VEMS. Dans cette cohorte, les résultats étaient plus marqués dans la sous-population de patients non F508del homozygotes. Toute étude de génotypage nécessitant d'être répliquée dans une cohorte indépendante, nous avons ensuite analysé une cohorte homogène de plus de 1000 patients français F508del homozygotes. Dans cette cohorte, nous n'avons pas retrouvé l'association précédemment décrite. Aux vues de

l'ensemble de ces résultats, il semblait intéressant d'analyser des patients non F508del homozygotes, en distinguant ceux qui étaient porteurs de mutations sévères de *CFTR* et ceux ayant un phénotype intermédiaire. A ce jour, seuls 145 patients français au génotype sévère non F508del homozygotes ont pu être génotypés. Dans cette cohorte, l'haplotype AH8.1 montre une tendance similaire à notre première étude, bien que la différence ne soit pas significative. Au total, l'haplotype ancestral AH8.1 pourrait avoir un impact sur le phénotype respiratoire chez des patients sévères non homozygotes F508del mais des analyses complémentaires sont nécessaires. Nous poursuivons donc les génotypages dans ce dernier groupe de patients. Nous prévoyons également de génotyper les patients présentant des mutations « modérées » de *CFTR*, associées à un phénotype intermédiaire. L'identification de cet haplotype en tant que modificateur permettrait de cibler précocement les enfants les plus à risque de développer une forme sévère de la maladie et d'adapter la stratégie thérapeutique.

Il faut souligner de plus que cet haplotype est situé dans le complexe HLA, impliqué dans la réponse immuno-inflammatoire. L'haplotype ancestral AH8.1 est ainsi défini par certains constituants du système HLA de classe I et II. Il serait intéressant de réaliser un typage HLA chez les patients atteints de la mucoviscidose, afin d'évaluer si ces patients ont des caractéristiques HLA particulières, associées à la sévérité de leur atteinte respiratoire. A ce jour, nous n'avons pas connaissance de telles études et envisageons donc d'analyser le complexe HLA. Le typage des patients est très coûteux, nous étudierons donc ce complexe dans un premier temps par une reconstruction appropriée des GWAS qui ont été réalisés chez une partie des patients du projet national des gènes modificateurs. Il est de plus utile de rappeler ici que les résultats récemment publiés des GWAS réalisés par le consortium Nord-Américain des gènes modificateurs de la mucoviscidose, ont montré que certains variants du système HLA de classe I (en position 6p21.3) pouvaient être associés à la sévérité de l'atteinte respiratoire (résultat non significatif mais tendance à confirmer) (Wright et al. 2011). Cette région est très proche de celle qui concerne notre haplotype et des collaborations sont en cours afin d'affiner ces résultats, les 2 consortiums, Nord-Américain et Français, collaborant depuis près de 2 ans maintenant (consortium international).

Analyses fonctionnelles des polymorphismes

L'identification d'une association entre un gène ou un haplotype et un caractère phénotypique n'implique pas l'existence d'une relation de cause à effet, d'où la nécessité de compléter ce type d'étude par des analyses biologiques et des études de fonctionnalité. Or il

est difficile d'inclure la totalité de l'haplotype dans un vecteur et de le transférer secondairement dans une cellule sans en perturber le fonctionnement. L'idéal serait de réaliser une analyse *ex vivo* à l'aide de cellules de patients porteurs de l'haplotype et de mutations différentes de *CFTR*. Pour le moment, nous avons comme second objectif d'étudier l'influence biologique de chacun des polymorphismes composant l'haplotype isolément.

RAGE

La protéine RAGE, majoritairement exprimée au niveau pulmonaire et impliquée dans la réponse inflammatoire et dans la croissance pulmonaire, a déjà été impliquée dans des pathologies inflammatoires et pulmonaires, c'est pourquoi il s'agit du premier variant auquel nous nous sommes intéressés. Nous avons étudié l'impact de *AGER* sur le phénotype respiratoire et l'expression protéique. Nous avons retrouvé une association entre le variant *AGER-429T/C* et la sévérité du phénotype respiratoire dans la cohorte française de patients homozygotes F508del. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que le score de KNoRMA est perturbé, or comme nous l'avons vu précédemment ce score est spécifiquement adapté à la mucoviscidose et adapté en fonction de la survie des patients. De plus, *in vitro*, nous avons montré que ce variant est associé à une augmentation d'activité du promoteur. On peut donc supposer que ce polymorphisme induirait une augmentation de production de la protéine, impliquée dans l'inflammation. Enfin, il existe une augmentation de la forme sécrétée sRAGE et du ligand HMGB1 chez des patients atteints de mucoviscidose par rapport à des témoins. Aucune association n'a été retrouvée entre ces taux et le polymorphisme.

Une étude antérieure avait retrouvé une augmentation de RAGE au niveau des polynucléaires neutrophiles des voies aériennes par rapport au plasma et une relation inverse pour sRAGE (Makam et al. 2009). Dans notre étude, nous retrouvons une augmentation des taux de sRAGE chez des patients atteints de mucoviscidose par rapport à des témoins. Il semblerait intéressant de rechercher une corrélation entre les taux de RAGE et de sRAGE afin de pouvoir utiliser le dosage plasmatique de sRAGE comme un marqueur spécifique d'inflammation. En effet, ce dosage est peu invasif, nécessitant uniquement un prélèvement sanguin et il aurait l'avantage d'avoir une spécificité d'organe étant majoritairement exprimé par le poumon. Afin de vérifier cette hypothèse, il pourrait être utile de doser la protéine lors de chaque exacerbation et en fin de traitement afin d'évaluer l'existence de seuils et l'intérêt dans le suivi des patients.

Contrôler l'inflammation des voies respiratoires dans la mucoviscidose par des thérapeutiques ciblées est d'une importance capitale et de nombreux traitements à visée anti-inflammatoire ont été évalués (Koehler et al. 2004). A forte dose par voie orale et lorsqu'il est prescrit sur une longue période, l'ibuprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien, diminuerait le déclin de la fonction chez les patients atteints de mucoviscidose mais ne réduirait pas la fréquence des hospitalisations (Konstan et al. 1995). L'effet bénéfique des corticoïdes inhalés n'a pu être établi dans la mucoviscidose (Dezateux et al. 2000). Les macrolides sont actuellement de plus en plus utilisés comme anti-inflammatoire dans cette pathologie, bien que leur mécanismes d'action ne soient pas actuellement totalement élucidés (Cai et al. 2011). Néanmoins, il semblerait intéressant de développer des thérapeutiques ciblées et adaptées au génotype des individus. Actuellement, des anticorps anti-RAGE se développent dans d'autres pathologies inflammatoires où RAGE a pu être impliquée. Ainsi, dans la maladie d'Alzheimer, des anticorps anti-RAGE pourraient limiter la neurotoxicité de la maladie et un vaccin combiné à des anticorps anti β -amyloïdes serait plus efficace qu'en présence d'anti β -amyloïdes seuls (Webster et al. 2012). De même, dans le cancer pulmonaire, des anticorps anti-RAGE ont également permis de limiter la progression de la maladie et sont actuellement à l'étude dans le traitement des métastases (Mizumoto et al. 2012). Ces thérapeutiques pourraient être testées dans la mucoviscidose, où il existe une inflammation exacerbée et incontrôlée, avec une augmentation des taux de RAGE au niveau pulmonaire (Makam et al. 2009). Les anticorps pourraient être utilisés en traitement local afin de limiter les effets secondaires. Ce traitement serait d'autant plus utile chez les individus porteurs du variant *AGER* -429T/C, qui présentent une plus grande sévérité phénotypique, liée à l'inflammation. Bien sûr, Il faudra au préalable valider l'association entre les taux de RAGE pulmonaire dans des ECBC et la présence du variant dans une large cohorte de patient F508del homozygotes.

HSP

La protéine CFTR mutée est prise en charge par les HSPs pour être dégradée dans le protéasome. Comme lors de précédentes études, nous n'avons pas retrouvé d'impact du variant exonique *HSPA1B* 1267A/G sur la quantité de transcrit. De même, nous n'avons pas mis en évidence d'effet sur la stabilité de l'ARNm en sa présence. Néanmoins, nous avons retrouvé un effet sur la fonction respiratoire, chez des patients au génotype sévère non F508del homozygotes et surtout chez les femmes. Ces résultats nécessitent d'être confirmés sur une plus grande cohorte par génotypage associé à des études de fonctionnalité.

Ce polymorphisme pourrait entraîner une modification conformationnelle de la protéine. Afin de poursuivre les investigations pour ce variant, nous avons débuté la mise au point de western blot, afin de rechercher une différence de quantité de la protéine. Dans un second temps, il semblerait intéressant de voir s'il existe un retentissement sur l'affinité de HSP pour CFTR mutée, et donc sur la quantité de CFTR présente à la membrane. En cas de modification de l'affinité, il pourrait en découler un intérêt thérapeutique par le biais de la diminution de dégradation de CFTR, qui serait moins adresser au protéasome.

Famille du TNF

Concernant les 2 membres de la famille du TNF, TNF- α et LTA, leurs implications semblaient moins intéressantes. En effet, le gène du *TNF* avait déjà fait l'objet de nombreuses études aux résultats contradictoires. Une revue récente en dehors tout contexte pathologique n'a pas retrouvé d'association entre ce variant et les taux de TNF- α (Mekinian et al. 2011). Concernant le variant du *LTA*, il ne semble pas qu'il ait un impact sur l'épissage alternatif d'après des études bio-informatiques réalisées au laboratoire.

Conclusion

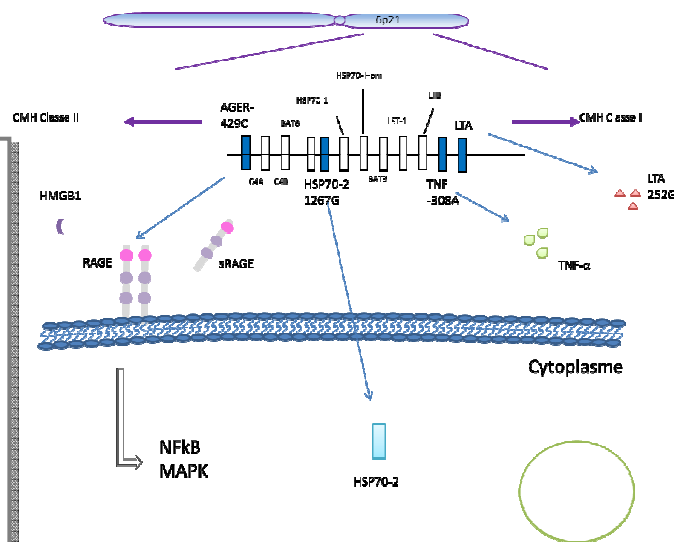
La mucoviscidose reste à ce jour la maladie à transmission autosomique récessive la plus létale. De nombreux progrès ont permis d'améliorer le pronostic de cette maladie, principalement la kinésithérapie, l'antibiothérapie et les extraits pancréatiques. Les connaissances physiopathologiques actuelles ont mené au développement de stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires, du fait d'une inflammation exacerbée. De plus, les études de jumeaux ont amené le concept de gènes modificateurs, responsables de variations phénotypiques indépendamment des facteurs d'environnement. La compréhension de la physiopathologie a conduit à étudier des gènes codant des protéines de l'inflammation. L'identification de gènes impliqués dans l'inflammation, tels que *AGER*, permettrait dans un second temps de développer des thérapeutiques adaptées et ciblées à chaque individu.

Haplotype ancestral AH8.1:

- Association entre l'AH8.1 et la sévérité de l'atteinte respiratoire dans une cohorte de 404 patients européens (Corvol et al. 2011)
- Résultats non retrouvés dans une population homogènes de 1039 patients français F508del homozygotes
- Résultats non répliqués dans une population de 145 patients français au phénotype sévère non F508del homozygotes, présence d'une tendance à confirmer

AGER-429T/C:

- Variant associé à une plus grande sévérité de l'atteinte respiratoire dans la cohorte de patients F508del homozygotes
- Variant associé à une plus grande activité du promoteur
- Taux plasmatique de sRAGE plus élevés dans la mucoviscidose par rapport à des témoins, absence de corrélation avec le variant



Famille du TNF:

- Absence de corrélation entre les taux plasmatiques de LTA ou TNF-α et leur variant respectif
- Absence d'association entre chacun des 2 variants et la sévérité de l'atteinte pulmonaire dans la cohorte de patients F508del homozygote

HSP70-2 1267A/G:

- Association du variant avec la fonction respiratoire dans la cohorte de patients au génotype sévère non F508del homozygotes, surtout chez les femmes
- Absence d'effet du variant sur la quantité de transcrit
- Absence de modification de la stabilité de l'ARNm en présence du variant

Figure 33 Effet de l'haplotype ancestral AH8.1 et des gènes qui le composent

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, E., J. Arcaroli, A. Carmody, et al. (2000). "HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation." J Immunol **165**(6): 2950-4.
- Accurso, F. J. and M. K. Sontag (2003). "Seeking modifier genes in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **167**(3): 289-90.
- Acton, J. D. and R. W. Wilmott (2001). "Phenotype of CF and the effects of possible modifier genes." Paediatr Respir Rev **2**(4): 332-9.
- Admyre, C., J. Grunewald, J. Thyberg, et al. (2003). "Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid." Eur Respir J **22**(4): 578-83.
- Aladzsity, I., K. Madach, A. Szilagyi, et al. (2011). "Analysis of the 8.1 ancestral MHC haplotype in severe, pneumonia-related sepsis." Clin Immunol **139**(3): 282-9.
- Andersson, U., H. Erlandsson-Harris, H. Yang, et al. (2002). "HMGB1 as a DNA-binding cytokine." J Leukoc Biol **72**(6): 1084-91.
- Arkwright, P. D., V. Pravica, P. J. Geraghty, et al. (2003). "End-organ dysfunction in cystic fibrosis: association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms." Am J Respir Crit Care Med **167**(3): 384-9.
- Armstrong, D. S., K. Grimwood, J. B. Carlin, et al. (1997). "Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **156**(4 Pt 1): 1197-204.
- Armstrong, D. S., K. Grimwood, R. Carzino, et al. (1995). "Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis." Bmj **310**(6994): 1571-2.
- Arya, R., M. Mallik and S. C. Lakhota (2007). "Heat shock genes - integrating cell survival and death." J Biosci **32**(3): 595-610.
- Asea, A., S. K. Kraeft, E. A. Kurt-Jones, et al. (2000). "HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine." Nat Med **6**(4): 435-42.
- Asea, A., M. Rehli, E. Kabingu, et al. (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." J Biol Chem **277**(17): 15028-34.
- Balog, A., Z. Gyulai, L. G. Boros, et al. (2005). "Polymorphism of the TNF-alpha, HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis." Pancreas **30**(2): e46-50.
- Balough, K., M. McCubbin, M. Weinberger, et al. (1995). "The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis." Pediatr Pulmonol **20**(2): 63-70.
- Baltimore, R. S. and M. Mitchell (1980). "Immunologic investigations of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of susceptibility to opsonic antibody in mucoid and nonmucoid strains." J Infect Dis **141**(2): 238-47.
- Baluk, P., T. Tammela, E. Ator, et al. (2005). "Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation." J Clin Invest **115**(2): 247-57.
- Banks, T. A., B. T. Rouse, M. K. Kerley, et al. (1995). "Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness." J Immunol **155**(4): 1685-93.
- Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med **336**(15): 1066-71.
- Bartlett, J. R., K. J. Friedman, S. C. Ling, et al. (2009). "Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis." Jama **302**(10): 1076-83.
- Bartling, B., H. S. Hofmann, B. Weigle, et al. (2005). "Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma." Carcinogenesis **26**(2): 293-301.

- Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, et al. (2000). "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." *Int Immunol* **12**(11): 1539-46.
- Bausero, M. A., R. Gastpar, G. Multhoff, et al. (2005). "Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72." *J Immunol* **175**(5): 2900-12.
- Baxter, P. S., J. Goldhill, J. Hardcastle, et al. (1988). "Accounting for cystic fibrosis." *Nature* **335**(6187): 211.
- Beere, H. M. (2004). ""The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis." *J Cell Sci* **117**(Pt 13): 2641-51.
- Berry, M. A., B. Hargadon, M. Shelley, et al. (2006). "Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma." *N Engl J Med* **354**(7): 697-708.
- Beutler, B. and A. Cerami (1989). "The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response." *Annu Rev Immunol* **7**: 625-55.
- Bhatnagar, S., K. Shinagawa, F. J. Castellino, et al. (2007). "Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo." *Blood* **110**(9): 3234-44.
- Bierhaus, A., S. Schiekofer, M. Schwaninger, et al. (2001). "Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB." *Diabetes* **50**(12): 2792-808.
- Birrer, P., N. G. McElvaney, A. Rudeberg, et al. (1994). "Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **150**(1): 207-13.
- Bjarnsholt, T., P. O. Jensen, M. J. Fiandaca, et al. (2009). "Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients." *Pediatr Pulmonol* **44**(6): 547-58.
- Blackman, S. M., R. Deering-Brose, R. McWilliams, et al. (2006). "Relative contribution of genetic and nongenetic modifiers to intestinal obstruction in cystic fibrosis." *Gastroenterology* **131**(4): 1030-9.
- Blackman, S. M., S. Hsu, S. E. Ritter, et al. (2009). "A susceptibility gene for type 2 diabetes confers substantial risk for diabetes complicating cystic fibrosis." *Diabetologia* **52**(9): 1858-65.
- Bonaldi, T., F. Talamo, P. Scaffidi, et al. (2003). "Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion." *Embo J* **22**(20): 5551-60.
- Bonfield, T. L., M. W. Konstan, P. Burfeind, et al. (1995). "Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**(3): 257-61.
- Bonfield, T. L., J. R. Panuska, M. W. Konstan, et al. (1995). "Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs." *Am J Respir Crit Care Med* **152**(6 Pt 1): 2111-8.
- Boor, P., P. Celec, K. Klenovicsova, et al. (2010). "Association of biochemical parameters and RAGE gene polymorphisms in healthy infants and their mothers." *Clin Chim Acta* **411**(15-16): 1034-40.
- Bopp, C., S. Hofer, J. Weitz, et al. (2008). "sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome." *J Surg Res* **147**(1): 79-83.
- Boucher, R. C. (2004). "New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease." *Eur Respir J* **23**(1): 146-58.
- Bradding, P., J. A. Roberts, K. M. Britten, et al. (1994). "Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines." *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**(5): 471-80.
- Bremer, L. A., S. M. Blackman, L. L. Vanscoy, et al. (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.
- Brett, J., A. M. Schmidt, S. D. Yan, et al. (1993). "Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues." *Am J Pathol* **143**(6): 1699-712.

- Brouard, J., N. Knauer, P. Y. Boelle, et al. (2005). "Influence of interleukin-10 on *Aspergillus fumigatus* infection in patients with cystic fibrosis." *J Infect Dis* **191**(11): 1988-91.
- Buranawuti, K., M. P. Boyle, S. Cheng, et al. (2007). "Variants in mannose-binding lectin and tumour necrosis factor alpha affect survival in cystic fibrosis." *J Med Genet* **44**(3): 209-14.
- Burke, W., M. L. Aitken, S. H. Chen, et al. (1992). "Variable severity of pulmonary disease in adults with identical cystic fibrosis mutations." *Chest* **102**(2): 506-9.
- Bustin, M. (1999). "Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5237-46.
- Cai, Y., D. Chai, R. Wang, et al. (2011). "Effectiveness and safety of macrolides in cystic fibrosis patients: a meta-analysis and systematic review." *J Antimicrob Chemother* **66**(5): 968-78.
- Calfee, C. S., M. M. Budev, M. A. Matthay, et al. (2007). "Plasma receptor for advanced glycation end-products predicts duration of ICU stay and mechanical ventilation in patients after lung transplantation." *J Heart Lung Transplant* **26**(7): 675-80.
- Calfee, C. S., L. B. Ware, M. D. Eisner, et al. (2008). "Plasma receptor for advanced glycation end products and clinical outcomes in acute lung injury." *Thorax* **63**(12): 1083-9.
- Cameron, P. U., S. A. Mallal, M. A. French, et al. (1990). "Major histocompatibility complex genes influence the outcome of HIV infection. Ancestral haplotypes with C4 null alleles explain diverse HLA associations." *Hum Immunol* **29**(4): 282-95.
- Campbell, P. W., 3rd, J. A. Phillips, 3rd, M. R. Krishnamani, et al. (1991). "Cystic fibrosis: relationship between clinical status and F508 deletion." *J Pediatr* **118**(2): 239-41.
- Candore, G., C. R. Balistreri, A. M. Campagna, et al. (2006). "Genetic control of immune response in carriers of ancestral haplotype 8.1: the study of chemotaxis." *Ann N Y Acad Sci* **1089**: 509-15.
- Candore, G., A. M. Campagna, I. Cuppari, et al. (2007). "Genetic control of immune response in carriers of the 8.1 ancestral haplotype: correlation with levels of IgG subclasses: its relevance in the pathogenesis of autoimmune diseases." *Ann N Y Acad Sci* **1110**: 151-8.
- Candore, G., D. Lio, G. Colonna Romano, et al. (2002). "Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions." *Autoimmun Rev* **1**(1-2): 29-35.
- Candore, G., M. A. Modica, D. Lio, et al. (2003). "Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: a genetically determined defect of C4 influences immunological parameters of healthy carriers of the haplotype." *Biomed Pharmacother* **57**(7): 274-7.
- Carlsson, M., A. G. Sjöholm, L. Eriksson, et al. (2005). "Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship." *Clin Exp Immunol* **139**(2): 306-13.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(9): 3666-70.
- Caruso, C., G. Candore, G. Colonna Romano, et al. (2000). "HLA, aging, and longevity: a critical reappraisal." *Hum Immunol* **61**(9): 942-9.
- Caruso, C., G. Candore, M. A. Modica, et al. (1996). "Major histocompatibility complex regulation of cytokine production." *J Interferon Cytokine Res* **16**(12): 983-8.
- Chalmin, F., S. Ladoire, G. Mignot, et al. (2010). "Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells." *J Clin Invest* **120**(2): 457-71.
- Chang, H. Y. and X. Yang (2000). "Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 821-46.
- Changchun, H., Z. Haijin, L. Wenjun, et al. (2011). "Increased heat shock protein 70 levels in induced sputum and plasma correlate with severity of asthma patients." *Cell Stress Chaperones*.
- Chen, Y., T. S. Voegeli, P. P. Liu, et al. (2007). "Heat shock paradox and a new role of heat shock proteins and their receptors as anti-inflammation targets." *Inflamm Allergy Drug Targets* **6**(2): 91-100.

- Cheng, S. H., R. J. Gregory, J. Marshall, et al. (1990). "Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis." Cell **63**(4): 827-34.
- Christie, J. D., C. V. Shah, S. M. Kawut, et al. (2009). "Plasma levels of receptor for advanced glycation end products, blood transfusion, and risk of primary graft dysfunction." Am J Respir Crit Care Med **180**(10): 1010-5.
- Coakley, R. J., C. Taggart, G. Canny, et al. (2000). "Altered intracellular pH regulation in neutrophils from patients with cystic fibrosis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(1): L66-74.
- Collaco JM, Blackman SM, McGready J, et al. (2010). "Quantification of the relative contribution of environmental and genetic factors to variation in cystic fibrosis lung function." J Pediatr **157**(5):802-7.
- Colombo, C., D. Costantini, A. Rocchi, et al. (2005). "Cytokine levels in sputum of cystic fibrosis patients before and after antibiotic therapy." Pediatr Pulmonol **40**(1): 15-21.
- Colombo, C., N. Faelli, A. S. Tirelli, et al. (2011). "Analysis of inflammatory and immune response biomarkers in sputum and exhaled breath condensate by a multi-parametric biochip array in cystic fibrosis." Int J Immunopathol Pharmacol **24**(2): 423-32.
- Corey, M., P. Durie, D. Moore, et al. (1989). "Familial concordance of pancreatic function in cystic fibrosis." J Pediatr **115**(2): 274-7.
- Corey, M. and V. Farewell (1996). "Determinants of mortality from cystic fibrosis in Canada, 1970-1989." Am J Epidemiol **143**(10): 1007-17.
- Corvol, H., J. Beucher, P. Y. Boelle, et al. (2011). "Ancestral haplotype 8.1 and lung disease severity in European cystic fibrosis patients." J Cyst Fibros.
- Corvol, H., P. Y. Boelle, J. Brouard, et al. (2008). "Genetic variations in inflammatory mediators influence lung disease progression in cystic fibrosis." Pediatr Pulmonol **43**(12): 1224-32.
- Crossley, J. R., R. B. Elliott and P. A. Smith (1979). "Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn." Lancet **1**(8114): 472-4.
- Cuppens, H., W. Lin, M. Jaspers, et al. (1998). "Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation." J Clin Invest **101**(2): 487-96.
- D'Alfonso, S., N. Cappello, G. Mazzola, et al. (1994). "Frequencies of HLA class II alleles in Piedmont (northern Italy)." Gene Geogr **8**(1): 55-66.
- Dakin, C. J., A. H. Numa, H. Wang, et al. (2002). "Inflammation, infection, and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **165**(7): 904-10.
- Dalzell, A. M., R. W. Shepherd, B. Dean, et al. (1992). "Nutritional rehabilitation in cystic fibrosis: a 5 year follow-up study." J Pediatr Gastroenterol Nutr **15**(2): 141-5.
- Davidson, D. J., J. R. Dorin, G. McLachlan, et al. (1995). "Lung disease in the cystic fibrosis mouse exposed to bacterial pathogens." Nat Genet **9**(4): 351-7.
- Davies, J. C., M. W. Turner and N. Klein (2004). "Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles." Eur Respir J **24**(5): 798-804.
- De Braekeleer, M., C. Allard, J. P. Leblanc, et al. (1997). "Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation." Hum Genet **101**(2): 208-11.
- de Faria, E. J., I. C. de Faria, J. D. Ribeiro, et al. (2009). "Association of MBL2, TGF-beta1 and CD14 gene polymorphisms with lung disease severity in cystic fibrosis." J Bras Pneumol **35**(4): 334-42.
- De Maio, A. "Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa." Cell Stress Chaperones **16**(3): 235-49.
- Degli-Esposti, M. A., A. L. Leaver, F. T. Christiansen, et al. (1992). "Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes." Hum Immunol **34**(4): 242-52.

- Delacourt, C., M. Le Bourgeois, M. P. D'Ortho, et al. (1995). "Imbalance between 95 kDa type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases in sputum of patients with cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **152**(2): 765-74.
- Demling, N., C. Ehrhardt, M. Kasper, et al. (2006). "Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells." *Cell Tissue Res* **323**(3): 475-88.
- Demoor, T., K. R. Bracke, T. Maes, et al. (2009). "Role of lymphotoxin-alpha in cigarette smoke-induced inflammation and lymphoid neogenesis." *Eur Respir J* **34**(2): 405-16.
- Devoto, M., L. De Benedetti, M. Seia, et al. (1989). "Haplotypes in cystic fibrosis patients with or without pancreatic insufficiency from four European populations." *Genomics* **5**(4): 894-8.
- Dezateux, C., S. Walters and I. Balfour-Lynn (2000). "Inhaled corticosteroids for cystic fibrosis." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD001915.
- Dhingra, R., M. G. Larson, E. J. Benjamin, et al. (2006). "Cross-sectional correlates of serum heat shock protein 70 in the community." *Am J Hypertens* **19**(2): 227-31; discussion 232-3.
- Donato, R. (1999). "Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type." *Biochim Biophys Acta* **1450**(3): 191-231.
- Donato, R. (2001). "S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(7): 637-68.
- Dorfman, R., W. Li, L. Sun, et al. (2009). "Modifier gene study of meconium ileus in cystic fibrosis: statistical considerations and gene mapping results." *Hum Genet* **126**(6): 763-78.
- Dorfman, R., A. Sandford, C. Taylor, et al. (2008). "Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis." *J Clin Invest* **118**(3): 1040-9.
- Dork, T., U. Wulbrand, T. Richter, et al. (1991). "Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene." *Hum Genet* **87**(4): 441-6.
- Drayton, D. L., S. Liao, R. H. Mounzer, et al. (2006). "Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis." *Nat Immunol* **7**(4): 344-53.
- Drumm, M. L. (2001). "Modifier genes and variation in cystic fibrosis." *Respir Res* **2**(3): 125-8.
- Drumm, M. L., M. W. Konstan, M. D. Schluchter, et al. (2005). "Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis." *N Engl J Med* **353**(14): 1443-53.
- Du, M., X. Liu, E. M. Welch, et al. (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.
- Dumitriu, I. E., P. Baruah, M. E. Bianchi, et al. (2005). "Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **35**(7): 2184-90.
- Eigen, H., B. J. Rosenstein, S. FitzSimmons, et al. (1995). "A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group." *J Pediatr* **126**(4): 515-23.
- Elkins, M. R., M. Robinson, B. R. Rose, et al. (2006). "A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis." *N Engl J Med* **354**(3): 229-40.
- Emerson, J., M. Rosenfeld, S. McNamara, et al. (2002). "Pseudomonas aeruginosa and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis." *Pediatr Pulmonol* **34**(2): 91-100.
- Englert, J. M., L. E. Hanford, N. Kaminski, et al. (2008). "A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Pathol* **172**(3): 583-91.
- Fanen, P. (1999). "La mucoviscidose et le gène CFTR." *Infobiogen* www.infobiogen.fr/services/.
- Favatier, F., L. Bornman, L. E. Hightower, et al. (1997). "Variation in hsp gene expression and Hsp polymorphism: do they contribute to differential disease susceptibility and stress tolerance?" *Cell Stress Chaperones* **2**(3): 141-55.
- Febbraio, M. A., A. Steensberg, R. Walsh, et al. (2002). "Reduced glycogen availability is associated with an elevation in HSP72 in contracting human skeletal muscle." *J Physiol* **538**(Pt 3): 911-7.

- Fehrenbach, E., A. M. Niess, K. Voelker, et al. (2005). "Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72." Int J Sports Med **26**(7): 552-7.
- Ferrari, M. and L. Cremonesi (1996). "Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients." Ann Biol Clin (Paris) **54**(6): 235-41.
- Feuillet-Fieux, M. N., T. Nguyen-Khoa, M. A. Lorient, et al. (2009). "Glutathione S-transferases related to *P. aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis children: preliminary study." Clin Biochem **42**(1-2): 57-63.
- Fiuza, C., M. Bustin, S. Talwar, et al. (2003). "Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells." Blood **101**(7): 2652-60.
- Flamant, C., A. Henrion-Caude, P. Y. Boelle, et al. (2004). "Glutathione-S-transferase M1, M3, P1 and T1 polymorphisms and severity of lung disease in children with cystic fibrosis." Pharmacogenetics **14**(5): 295-301.
- Foell, D., S. Seeliger, T. Vogl, et al. (2003). "Expression of S100A12 (EN-RAGE) in cystic fibrosis." Thorax **58**(7): 613-7.
- Gabolde, M., M. Guilloud-Bataille, J. Feingold, et al. (1999). "Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort study." Bmj **319**(7218): 1166-7.
- Gabolde, M., S. Muralitharan and C. Besmond (1999). "Genotyping of the three major allelic variants of the human mannose-binding lectin gene by denaturing gradient gel electrophoresis." Hum Mutat **14**(1): 80-3.
- Gaens, K. H., I. Ferreira, C. J. van der Kallen, et al. (2009). "Association of polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating RAGE levels." J Clin Endocrinol Metab **94**(12): 5174-80.
- Gaggar, A., P. L. Jackson, B. D. Noerager, et al. (2008). "A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation." J Immunol **180**(8): 5662-9.
- Gaggar, A., Y. Li, N. Weathington, et al. (2007). "Matrix metalloprotease-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(1): L96-L104.
- Gan, K. H., H. J. Veeze, A. M. van den Ouweland, et al. (1995). "A cystic fibrosis mutation associated with mild lung disease." N Engl J Med **333**(2): 95-9.
- Gangell, C., S. Gard, T. Douglas, et al. (2011). "Inflammatory Responses to Individual Microorganisms in the Lungs of Children With Cystic Fibrosis." Clin Infect Dis **53**(5): 425-432.
- Ganter, M. T., L. B. Ware, M. Howard, et al. (2006). "Extracellular heat shock protein 72 is a marker of the stress protein response in acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **291**(3): L354-61.
- Garred, P., T. Pressler, H. O. Madsen, et al. (1999). "Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis." J Clin Invest **104**(4): 431-7.
- Gasparini, P., G. Novelli, X. Estivill, et al. (1990). "The genotype of a new linked DNA marker, MP6d-9, is related to the clinical course of cystic fibrosis." J Med Genet **27**(1): 17-20.
- Giacconi, R., C. Caruso, D. Lio, et al. (2005). "1267 HSP70-2 polymorphism as a risk factor for carotid plaque rupture and cerebral ischaemia in old type 2 diabetes-atherosclerotic patients." Mech Ageing Dev **126**(8): 866-73.
- Giacconi, R., C. Cipriano, E. Muti, et al. (2006). "Involvement of -308 TNF-alpha and 1267 Hsp70-2 polymorphisms and zinc status in the susceptibility of coronary artery disease (CAD) in old patients." Biogerontology **7**(5-6): 347-56.
- Gombos, T., Z. Forhecz, Z. Pozsonyi, et al. (2008). "Interaction of serum 70-kDa heat shock protein levels and HspA1B (+1267) gene polymorphism with disease severity in patients with chronic heart failure." Cell Stress Chaperones **13**(2): 199-206.

- Goss, C. H., S. A. Newsom, J. S. Schildcrout, et al. (2004). "Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **169**(7): 816-21.
- Gosset, P., A. Tsicopoulos, B. Wallaert, et al. (1991). "Increased secretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction." J Allergy Clin Immunol **88**(4): 561-71.
- Greally, P., M. J. Hussein, A. J. Cook, et al. (1993). "Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis." Arch Dis Child **68**(3): 389-92.
- Green, A., P. Dodds and C. Pennock (1985). "A study of sweat sodium and chloride; criteria for the diagnosis of cystic fibrosis." Ann Clin Biochem **22** (Pt 2): 171-4.
- Greenlee, K. J., Z. Werb and F. Kheradmand (2007). "Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted." Physiol Rev **87**(1): 69-98.
- Grom, A. A., K. J. Murray, L. Luyrink, et al. (1996). "Patterns of expression of tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta, and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathy." Arthritis Rheum **39**(10): 1703-10.
- Halayko, A. J. and S. Ghavami (2009). "S100A8/A9: a mediator of severe asthma pathogenesis and morbidity?" Can J Physiol Pharmacol **87**(10): 743-55.
- Hamosh, A., B. C. Trapnell, P. L. Zeitlin, et al. (1991). "Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis." J Clin Invest **88**(6): 1880-5.
- Hancock, D. B., M. Eijgelsheim, J. B. Wilk, et al. (2010). "Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function." Nat Genet **42**(1): 45-52.
- Hanford, L. E., C. L. Fattman, L. M. Shaefer, et al. (2003). "Regulation of receptor for advanced glycation end products during bleomycin-induced lung injury." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(3 Suppl): S77-81.
- Hankinson, J. L., J. R. Odencrantz and K. B. Fedan (1999). "Spirometric reference values from a sample of the general U.S. population." Am J Respir Crit Care Med **159**(1): 179-87.
- HAS (2006). "Haute Autorité de Santé. Mucoviscidose Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare. ."
- HAS (2008). "Mucoclear." Haute autorité de santé.
- Henrion-Caude, A., C. Flamant, M. Roussey, et al. (2002). "Liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis is associated with glutathione S-transferase P1 polymorphism." Hepatology **36**(4 Pt 1): 913-7.
- Hillian, A. D., D. Londono, J. M. Dunn, et al. (2008). "Modulation of cystic fibrosis lung disease by variants in interleukin-8." Genes Immun **9**(6): 501-8.
- Hilliard, T. N., N. Regamey, J. K. Shute, et al. (2007). "Airway remodelling in children with cystic fibrosis." Thorax **62**(12): 1074-80.
- Hirawat, S., E. M. Welch, G. L. Elfring, et al. (2007). "Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers." J Clin Pharmacol **47**(4): 430-44.
- Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, et al. (2002). "Multiple control of interleukin-8 gene expression." J Leukoc Biol **72**(5): 847-55.
- Hofmann, M. A., S. Drury, C. Fu, et al. (1999). "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides." Cell **97**(7): 889-901.
- Hoiby, N., O. Ciofu and T. Bjarnsholt (2010). "Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis." Future Microbiol **5**(11): 1663-74.
- Holmes, C. L., J. A. Russell and K. R. Walley (2003). "Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy." Chest **124**(3): 1103-15.

- Hori, O., J. Brett, T. Slattery, et al. (1995). "The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system." *J Biol Chem* **270**(43): 25752-61.
- Hou, C., H. Zhao, L. Liu, et al. "HMGB1 in Asthma: comparison with COPD patients and health controls." *Mol Med*.
- Howarth, P. H., K. S. Babu, H. S. Arshad, et al. (2005). "Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma." *Thorax* **60**(12): 1012-8.
- Huang, S. L., C. H. Su and S. C. Chang (1997). "Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis." *Am J Respir Crit Care Med* **156**(5): 1436-9.
- Hudson, B. I., M. H. Stickland, T. S. Futers, et al. (2001). "Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy." *Diabetes* **50**(6): 1505-11.
- Hull, J. and A. H. Thomson (1998). "Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis." *Thorax* **53**(12): 1018-21.
- Hunter, M. J., K. J. Treharne, A. K. Winter, et al. (2010). "Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling." *PLoS One* **5**(7): e11598.
- Ivanov, S., A. M. Dragoi, X. Wang, et al. (2007). "A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA." *Blood* **110**(6): 1970-81.
- Jaattela, M. and D. Wissing (1993). "Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection." *J Exp Med* **177**(1): 231-6.
- Jaattela, M., D. Wissing, P. A. Bauer, et al. (1992). "Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity." *Embo J* **11**(10): 3507-12.
- Jackson, P. L., X. Xu, L. Wilson, et al. (2010). "Human neutrophil elastase-mediated cleavage sites of MMP-9 and TIMP-1: implications to cystic fibrosis proteolytic dysfunction." *Mol Med* **16**(5-6): 159-66.
- Janeway C, T. P., Walport M, Capra JD (1999). "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." *New York, NY: Elsevier Science Ltd./Garland Publishing* **292**: 598-608.
- Johansen, H. K., M. Nir, N. Hoiby, et al. (1991). "Severity of cystic fibrosis in patients homozygous and heterozygous for delta F508 mutation." *Lancet* **337**(8742): 631-4.
- John, M., E. Ecclestone, E. Hunter, et al. (1994). "Epidemiology of Pseudomonas cepacia colonization among patients with cystic fibrosis." *Pediatr Pulmonol* **18**(2): 108-13.
- Kaijzel, E. L., J. P. Bayley, M. V. van Krugten, et al. (2001). "Allele-specific quantification of tumor necrosis factor alpha (TNF) transcription and the role of promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis patients and healthy individuals." *Genes Immun* **2**(3): 135-44.
- Kalinina, N., A. Agrotis, Y. Antropova, et al. (2004). "Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(12): 2320-5.
- Kalousova, M., M. Jachymova, O. Mestek, et al. (2007). "Receptor for advanced glycation end products--soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients." *Nephrol Dial Transplant* **22**(7): 2020-6.
- Kaluza, W., E. Reuss, S. Grossmann, et al. (2000). "Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism." *J Invest Dermatol* **114**(6): 1180-3.
- Karin, M., Z. Liu and E. Zandi (1997). "AP-1 function and regulation." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 240-6.
- Kasper M, B. A., Nawroth PP (2003). "Pulmonary pathology of knockouts in mice lacking type I pneumocyte antigens." *Ann Anat* **185** (suppl): A144.
- Kee, C., K. Y. Cheong, K. Pham, et al. (2008). "Genetic variation in heat shock protein 70 is associated with septic shock: narrowing the association to a specific haplotype." *Int J Immunogenet* **35**(6): 465-73.

- Kerem, E., M. Corey, B. Kerem, et al. (1989). "Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis, with or without meconium ileus." J Pediatr **114**(5): 767-73.
- Kerem, E., M. Corey, B. S. Kerem, et al. (1990). "The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508)." N Engl J Med **323**(22): 1517-22.
- Kerem, E., S. Hirawat, S. Armoni, et al. (2008). "Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial." Lancet **372**(9640): 719-27.
- Kerem, E., J. Reisman, M. Corey, et al. (1992). "Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis." N Engl J Med **326**(18): 1187-91.
- Kerkhoff, C., M. Klempt and C. Sorg (1998). "Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9)." Biochim Biophys Acta **1448**(2): 200-11.
- Kharazmi, A., P. O. Schiotz, N. Hoiby, et al. (1986). "Demonstration of neutrophil chemotactic activity in the sputum of cystic fibrosis patients with Pseudomonas aeruginosa infection." Eur J Clin Invest **16**(2): 143-8.
- Kiesewetter, S., M. Macek, Jr., C. Davis, et al. (1993). "A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background." Nat Genet **5**(3): 274-8.
- Kips, J. C., J. H. Tavernier, G. F. Joos, et al. (1993). "The potential role of tumour necrosis factor alpha in asthma." Clin Exp Allergy **23**(4): 247-50.
- Kirvela, O., R. C. Stern, J. Askanazi, et al. (1993). "Long-term parenteral nutrition in cystic fibrosis." Nutrition **9**(2): 119-26.
- Kiszel, P., M. Kovacs, C. Szalai, et al. (2007). "Frequency of carriers of 8.1 ancestral haplotype and its fragments in two Caucasian populations." Immunol Invest **36**(3): 307-19.
- Klausz, G., T. Molnar, F. Nagy, et al. (2005). "Polymorphism of the heat-shock protein gene Hsp70-2, but not polymorphisms of the IL-10 and CD14 genes, is associated with the outcome of Crohn's disease." Scand J Gastroenterol **40**(10): 1197-204.
- Knapp, S., S. Muller, G. Digilio, et al. (2004). "The long acidic tail of high mobility group box 1 (HMGB1) protein forms an extended and flexible structure that interacts with specific residues within and between the HMG boxes." Biochemistry **43**(38): 11992-7.
- Knowles, M. R., A. M. Paradiso and R. C. Boucher (1995). "In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis." Hum Gene Ther **6**(4): 445-55.
- Knudson, R. J., M. D. Lebowitz, C. J. Holberg, et al. (1983). "Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging." Am Rev Respir Dis **127**(6): 725-34.
- Knudson, R. J., R. C. Slatin, M. D. Lebowitz, et al. (1976). "The maximal expiratory flow-volume curve. Normal standards, variability, and effects of age." Am Rev Respir Dis **113**(5): 587-600.
- Koehler, D. R., G. P. Downey, N. B. Sweezey, et al. (2004). "Lung inflammation as a therapeutic target in cystic fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(4): 377-81.
- Kokkola, R., J. Li, E. Sundberg, et al. (2003). "Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity." Arthritis Rheum **48**(7): 2052-8.
- Kokkola, R., E. Sundberg, A. K. Ulfgren, et al. (2002). "High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis." Arthritis Rheum **46**(10): 2598-603.
- Konstan, M. W., P. J. Byard, C. L. Hoppel, et al. (1995). "Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis." N Engl J Med **332**(13): 848-54.
- Kopito, R. R. (1999). "Biosynthesis and degradation of CFTR." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S167-73.
- Kovesi, T., M. Corey and H. Levison (1993). "Passive smoking and lung function in cystic fibrosis." Am Rev Respir Dis **148**(5): 1266-71.
- Kroeger, K. M., K. S. Carville and L. J. Abraham (1997). "The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription." Mol Immunol **34**(5): 391-9.

- Kubesch, P., T. Dork, U. Wulbrand, et al. (1993). "Genetic determinants of airways' colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis." *Lancet* **341**(8839): 189-93.
- Kulich, M., M. Rosenfeld, J. Campbell, et al. (2005). "Disease-specific reference equations for lung function in patients with cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **172**(7): 885-91.
- Laki, J., I. Laki, K. Nemeth, et al. (2006). "The 8.1 ancestral MHC haplotype is associated with delayed onset of colonization in cystic fibrosis." *Int Immunol* **18**(11): 1585-90.
- Lamireau, T., S. Monnereau, S. Martin, et al. (2004). "Epidemiology of liver disease in cystic fibrosis: a longitudinal study." *J Hepatol* **41**(6): 920-5.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Leclerc, E., G. Fritz, M. Weibel, et al. (2007). "S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains." *J Biol Chem* **282**(43): 31317-31.
- Levy, H., A. Murphy, F. Zou, et al. (2009). "IL1B polymorphisms modulate cystic fibrosis lung disease." *Pediatr Pulmonol* **44**(6): 580-93.
- Li, Z., A. Menoret and P. Srivastava (2002). "Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation." *Curr Opin Immunol* **14**(1): 45-51.
- Lizotte, P. P., L. E. Hanford, J. J. Enghild, et al. (2007). "Developmental expression of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and its response to hyperoxia in the neonatal rat lung." *BMC Dev Biol* **7**: 15.
- Mackie, A. D., S. J. Thornton and F. P. Edenborough (2003). "Cystic fibrosis-related diabetes." *Diabet Med* **20**(6): 425-36.
- Maille, E., N. T. Trinh, A. Prive, et al. (2011). "Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-alpha after injury." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **301**(6): L945-55.
- Makam, M., D. Diaz, J. Laval, et al. (2009). "Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(14): 5779-83.
- Mambula, S. S. and S. K. Calderwood (2006). "Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes." *J Immunol* **177**(11): 7849-57.
- Martin, A. M., D. Nolan, S. Gaudieri, et al. (2004). "Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4180-5.
- Marty, N., C. Pasquier, J. L. Dournes, et al. (1998). "Effects of characterised *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharides on adherence to human tracheal cells." *J Med Microbiol* **47**(2): 129-34.
- Maruyama, K., M. Ii, C. Cursiefen, et al. (2005). "Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages." *J Clin Invest* **115**(9): 2363-72.
- Matera, M. G., L. Calzetta and M. Cazzola (2010). "TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water." *Pulm Pharmacol Ther* **23**(2): 121-8.
- Matthay, M. A., L. Robriquet and X. Fang (2005). "Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury." *Proc Am Thorac Soc* **2**(3): 206-13.
- Mauri, T., S. Masson, A. Pradella, et al. (2010). "Elevated plasma and alveolar levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts are associated with severity of lung dysfunction in ARDS patients." *Tohoku J Exp Med* **222**(2): 105-12.
- McElroy, M. C. and M. Kasper (2004). "The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair." *Eur Respir J* **24**(4): 664-73.
- Meacham, G. C., Z. Lu, S. King, et al. (1999). "The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis." *Embo J* **18**(6): 1492-505.
- Meacham, G. C., C. Patterson, W. Zhang, et al. (2001). "The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation." *Nat Cell Biol* **3**(1): 100-5.

- Mekinian, A., R. Tamouza, S. Pavy, et al. (2011). "Functional study of TNF-alpha promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis." Eur Cytokine Netw **22**(2): 88-102.
- Mekus, F., M. Ballmann, I. Bronsveld, et al. (2000). "Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics." Twin Res **3**(4): 277-93.
- Messer, G., U. Spengler, M. C. Jung, et al. (1991). "Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production." J Exp Med **173**(1): 209-19.
- Meyer, K. C., J. R. Lewandoski, J. J. Zimmerman, et al. (1991). "Human neutrophil elastase and elastase/alpha 1-antiprotease complex in cystic fibrosis. Comparison with interstitial lung disease and evaluation of the effect of intravenously administered antibiotic therapy." Am Rev Respir Dis **144**(3 Pt 1): 580-5.
- Midulla, F., A. Villani, R. Merolla, et al. (1995). "Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels." Pediatr Pulmonol **20**(2): 112-8.
- Milner, C. M. and R. D. Campbell (2001). "Genetic organization of the human MHC class III region." Front Biosci **6**: D914-26.
- Miniati, M., S. Monti, G. Basta, et al. (2011). "Soluble receptor for advanced glycation end products in COPD: relationship with emphysema and chronic cor pulmonale: a case-control study." Respir Res **12**: 37.
- Mizumoto, S., J. Takahashi and K. Sugahara (2012). "Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Functions as a Receptor for Specific Sulfated Glycosaminoglycans, and Anti-RAGE Antibody or The Sulfated Glycosaminoglycans Delivered in vivo Inhibit Pulmonary Metastasis of Tumor Cells." J Biol Chem.
- Moermans, C., V. Heinen, M. Nguyen, et al. (2011). "Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease." Cytokine.
- Moffatt, M. F. and W. O. Cookson (1997). "Tumour necrosis factor haplotypes and asthma." Hum Mol Genet **6**(4): 551-4.
- Moreau-Marquis, S., J. M. Bomberger, G. G. Anderson, et al. (2008). "The DeltaF508-CFTR mutation results in increased biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **295**(1): L25-37.
- Moretti, A. I., E. C. Rios, F. G. Soriano, et al. (2009). "Acute pancreatitis: hypertonic saline increases heat shock proteins 70 and 90 and reduces neutrophil infiltration in lung injury." Pancreas **38**(5): 507-14.
- Morral, N., J. Bertranpetit, X. Estivill, et al. (1994). "The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations." Nat Genet **7**(2): 169-75.
- Mounzer, R. H., O. S. Svendsen, P. Baluk, et al. (2010). "Lymphotoxin-alpha contributes to lymphangiogenesis." Blood **116**(12): 2173-82.
- Muhlebach, M. S., P. W. Stewart, M. W. Leigh, et al. (1999). "Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients." Am J Respir Crit Care Med **160**(1): 186-91.
- Muselet-Charlier, C., T. Roque, E. Boncoeur, et al. (2007). "Enhanced IL-1beta-induced IL-8 production in cystic fibrosis lung epithelial cells is dependent of both mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB signaling." Biochem Biophys Res Commun **357**(2): 402-7.
- Nakamura, T., E. Sato, N. Fujiwara, et al. (2011). "Increased levels of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and high mobility group box 1 (HMGB1) are associated with death in patients with acute respiratory distress syndrome." Clin Biochem **44**(8-9): 601-4.
- Nakano, M., A. A. Knowlton, T. Yokoyama, et al. (1996). "Tumor necrosis factor-alpha-induced expression of heat shock protein 72 in adult feline cardiac myocytes." Am J Physiol **270**(4 Pt 2): H1231-9.

- Neeper, M., A. M. Schmidt, J. Brett, et al. (1992). "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins." *J Biol Chem* **267**(21): 14998-5004.
- O'Connor, G. T., H. B. Quinton, T. Kneeland, et al. (2003). "Median household income and mortality rate in cystic fibrosis." *Pediatrics* **111**(4 Pt 1): e333-9.
- O'Neill, H. C. and B. J. Quah (2008). "Exosomes secreted by bacterially infected macrophages are proinflammatory." *Sci Signal* **1**(6): pe8.
- Ohlmeier, S., W. Mazur, K. Salmenkivi, et al. (2010). "Proteomic studies on receptor for advanced glycation end product variants in idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease." *Proteomics Clin Appl* **4**(1): 97-105.
- Oimomi, M., Y. Kitamura, S. Nishimoto, et al. (1986). "Age-related acceleration of glycation of tissue proteins in rats." *J Gerontol* **41**(6): 695-8.
- Ozaki, K., Y. Ohnishi, A. Iida, et al. (2002). "Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction." *Nat Genet* **32**(4): 650-4.
- Palleros, D. R., L. Shi, K. L. Reid, et al. (1994). "hsp70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein." *J Biol Chem* **269**(18): 13107-14.
- Parad, R. B., C. J. Gerard, D. Zurakowski, et al. (1999). "Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype." *Infect Immun* **67**(9): 4744-50.
- Pelaez, A., S. D. Force, A. A. Gal, et al. (2010). "Receptor for advanced glycation end products in donor lungs is associated with primary graft dysfunction after lung transplantation." *Am J Transplant* **10**(4): 900-7.
- Peng, W. H., L. Lu, L. J. Wang, et al. (2009). "RAGE gene polymorphisms are associated with circulating levels of endogenous secretory RAGE but not with coronary artery disease in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus." *Arch Med Res* **40**(5): 393-8.
- Picard, E., M. Aviram, Y. Yahav, et al. (2004). "Familial concordance of phenotype and microbial variation among siblings with CF." *Pediatr Pulmonol* **38**(4): 292-7.
- Pier, G. B., M. Grout, T. Zaidi, et al. (1998). "Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells." *Nature* **393**(6680): 79-82.
- Pilewski, J. M. and R. A. Frizzell (1999). "Role of CFTR in airway disease." *Physiol Rev* **79**(1 Suppl): S215-55.
- Pociot, F., J. Molvig, L. Wogensen, et al. (1991). "A tumour necrosis factor beta gene polymorphism in relation to monokine secretion and insulin-dependent diabetes mellitus." *Scand J Immunol* **33**(1): 37-49.
- Pociot, F., K. S. Ronningen and J. Nerup (1993). "Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)." *Scand J Immunol* **38**(5): 491-5.
- Pockley, A. G., J. Shepherd and J. M. Corton (1998). "Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals." *Immunol Invest* **27**(6): 367-77.
- Price, P., C. Witt, R. Allcock, et al. (1999). "The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases." *Immunol Rev* **167**: 257-74.
- Prohaszka, Z. and G. Fust (2004). "Immunological aspects of heat-shock proteins-the optimum stress of life." *Mol Immunol* **41**(1): 29-44.
- Prohaszka, Z., M. Singh, K. Nagy, et al. (2002). "Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system." *Cell Stress Chaperones* **7**(1): 17-22.
- Quan, J. M., H. A. Tiddens, J. P. Sy, et al. (2001). "A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities." *J Pediatr* **139**(6): 813-20.

- Queisser, M. A., F. M. Kouri, M. Konigshoff, et al. (2008). "Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types." Am J Respir Cell Mol Biol **39**(3): 337-45.
- Ramasamy, R., S. F. Yan and A. M. Schmidt (2009). "RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response--the evidence mounts." J Leukoc Biol **86**(3): 505-12.
- Ramsey, B. W., J. Davies, N. G. McElvaney, et al. (2011). "A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation." N Engl J Med **365**(18): 1663-72.
- Ran, R., A. Lu, L. Zhang, et al. (2004). "Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling." Genes Dev **18**(12): 1466-81.
- Ratjen, F., C. M. Hartog, K. Paul, et al. (2002). "Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha." Thorax **57**(11): 930-4.
- Raucci, A., S. Cugusi, A. Antonelli, et al. (2008). "A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10)." Faseb J **22**(10): 3716-27.
- Reddy, M. A., S. L. Li, S. Sahar, et al. (2006). "Key role of Src kinase in S100B-induced activation of the receptor for advanced glycation end products in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **281**(19): 13685-93.
- Regamey, N., P. K. Jeffery, E. W. Alton, et al. (2010). "Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis." Thorax **66**(7): 624-9.
- Repapi, E., I. Sayers, L. V. Wain, et al. (2010). "Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function." Nat Genet **42**(1): 36-44.
- Reynolds, P. R., J. A. Stogsdill, M. P. Stogsdill, et al. (2011). "Up-regulation of receptors for advanced glycation end-products by alveolar epithelium influences cytodifferentiation and causes severe lung hypoplasia." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(6): 1195-202.
- Rigot, J. M., J. J. Lafitte, V. Dumur, et al. (1991). "Cystic fibrosis and congenital absence of the vas deferens." N Engl J Med **325**(1): 64-5.
- Roderfeld, M., T. Rath, R. Schulz, et al. (2009). "Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation." J Cyst Fibros **8**(5): 338-47.
- Romey, M. C., C. Guittard, J. P. Chazalotte, et al. (1999). "Complex allele [-102T>A+S549R(T>G)] is associated with milder forms of cystic fibrosis than allele S549R(T>G) alone." Hum Genet **105**(1-2): 145-50.
- Rosenstein, B. J. and G. R. Cutting (1998). "The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel." J Pediatr **132**(4): 589-95.
- Rowe, S. M., P. L. Jackson, G. Liu, et al. (2008). "Potential role of high-mobility group box 1 in cystic fibrosis airway disease." Am J Respir Crit Care Med **178**(8): 822-31.
- Rowe, S. M., S. Miller and E. J. Sorscher (2005). "Cystic fibrosis." N Engl J Med **352**(19): 1992-2001.
- Rowntree, R. K. and A. Harris (2003). "The phenotypic consequences of CFTR mutations." Ann Hum Genet **67**(Pt 5): 471-85.
- Rubin, B. K. (1990). "Exposure of children with cystic fibrosis to environmental tobacco smoke." N Engl J Med **323**(12): 782-8.
- Ryckman, C., K. Vandal, P. Rouleau, et al. (2003). "Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion." J Immunol **170**(6): 3233-42.
- Saadane, A., J. Eastman, M. Berger, et al. (2011). "Parthenolide inhibits ERK and AP-1 which are dysregulated and contribute to excessive IL-8 expression and secretion in cystic fibrosis cells." J Inflamm (Lond) **8**: 26.
- Salvatore, F., O. Scudiero and G. Castaldo (2002). "Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes." Am J Med Genet **111**(1): 88-95.
- Sandford, A. J., T. Chagani, T. D. Weir, et al. (2001). "Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study." Am J Respir Crit Care Med **163**(2): 469-73.

- Santis, G., L. Osborne, R. Knight, et al. (1992). "Genotype-phenotype relationship in cystic fibrosis: results from the study of monozygotic and dizygotic twins with cystic fibrosis." Pediatr Pulmonol Suppl. **8**: 239-40.
- Santis, G., L. Osborne, R. A. Knight, et al. (1990). "Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis." Lancet **336**(8723): 1081-4.
- Santis, G., L. Osborne, R. A. Knight, et al. (1990). "Linked marker haplotypes and the delta F508 mutation in adults with mild pulmonary disease and cystic fibrosis." Lancet **335**(8703): 1426-9.
- Scaffidi, P., T. Misteli and M. E. Bianchi (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." Nature **418**(6894): 191-5.
- Schechter, M. S., B. J. Shelton, P. A. Margolis, et al. (2001). "The association of socioeconomic status with outcomes in cystic fibrosis patients in the United States." Am J Respir Crit Care Med **163**(6): 1331-7.
- Schluchter, M. D., M. W. Konstan and P. B. Davis (2002). "Jointly modelling the relationship between survival and pulmonary function in cystic fibrosis patients." Stat Med **21**(9): 1271-87.
- Schlueter, C., S. Hauke, A. M. Flohr, et al. (2003). "Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing?" Biochim Biophys Acta **1630**(1): 1-6.
- Schmitt-Grohe, S., F. Stuber, M. Book, et al. (2006). "TNF-alpha promoter polymorphism in relation to TNF-alpha production and clinical status in cystic fibrosis." Lung **184**(2): 99-104.
- Schraml, P., I. Bendik and C. U. Ludwig (1997). "Differential messenger RNA and protein expression of the receptor for advanced glycosylated end products in normal lung and non-small cell lung carcinoma." Cancer Res **57**(17): 3669-71.
- Schroeder, S., M. Reck, L. E. Lehmann, et al. (2000). "The PstI polymorphism of the endotoxin-inducible heat-shock protein 70-2 gene does not affect messenger RNA level in human whole-blood cultures." Intensive Care Med **26**(8): 1139-43.
- Scott-Ward, T. S. and M. D. Amaral (2009). "Deletion of Phe508 in the first nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator increases its affinity for the heat shock cognate 70 chaperone." Febs J **276**(23): 7097-109.
- Selmaj, K., C. S. Raine, B. Cannella, et al. (1991). "Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions." J Clin Invest **87**(3): 949-54.
- Sermet-Gaudelus, I., K. D. Boeck, G. J. Casimir, et al. (2010). "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.
- Sfar, S., H. Saad, F. Mosbah, et al. (2010). "Synergistic effect and VEGF/HSP70-hom haplotype analysis: relationship to prostate cancer risk and clinical outcome." Hum Immunol **71**(4): 377-82.
- Shang, G. H., C. Q. Jia, H. Tian, et al. (2009). "Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer." Respir Med **103**(12): 1949-53.
- Shepherd, R., W. G. Cooksley and W. D. Cooke (1980). "Improved growth and clinical, nutritional, and respiratory changes in response to nutritional therapy in cystic fibrosis." J Pediatr **97**(3): 351-7.
- Shibata, T., T. Arisawa, T. Tahara, et al. (2009). "Protective role of genetic polymorphism of heat shock protein 70-2 for gastric cancer risk." Dig Dis Sci **54**(1): 70-4.
- Shirasawa, M., N. Fujiwara, S. Hirabayashi, et al. (2004). "Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells." Genes Cells **9**(2): 165-74.
- Silverman, E. S., L. J. Palmer, V. Subramaniam, et al. (2004). "Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma." Am J Respir Crit Care Med **169**(2): 214-9.

- Simian, M., Y. Hirai, M. Navre, et al. (2001). "The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells." Development **128**(16): 3117-31.
- Singh, R., S. Kolvraa, P. Bross, et al. (2010). "Anti-inflammatory heat shock protein 70 genes are positively associated with human survival." Curr Pharm Des **16**(7): 796-801.
- Sly, P. D., S. Brennan, C. Gangell, et al. (2009). "Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening." Am J Respir Crit Care Med **180**(2): 146-52.
- Smith, D. J., S. T. Yerkovich, M. A. Towers, et al. (2011). "Reduced soluble receptor for advanced glycation end-products in COPD." Eur Respir J **37**(3): 516-22.
- Smyth, A., U. O'Hea, G. Williams, et al. (1994). "Passive smoking and impaired lung function in cystic fibrosis." Arch Dis Child **71**(4): 353-4.
- Srikrishna, G. and H. H. Freeze (2009). "Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer." Neoplasia **11**(7): 615-28.
- Srikrishna, G., H. J. Huttunen, L. Johansson, et al. (2002). "N -Glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphotericin binding and neurite outgrowth." J Neurochem **80**(6): 998-1008.
- Srivastava, P. (2002). "Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses." Annu Rev Immunol **20**: 395-425.
- Stamenkovic, I. (2003). "Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases." J Pathol **200**(4): 448-64.
- Stanke, F., T. Becker, H. Cuppens, et al. (2006). "The TNFalpha receptor TNFRSF1A and genes encoding the amiloride-sensitive sodium channel ENaC as modulators in cystic fibrosis." Hum Genet **119**(3): 331-43.
- Stankovic, M. M., A. R. Nestorovic, A. M. Tomovic, et al. (2009). "TNF-alpha-308 promotor polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer." Neoplasma **56**(4): 348-52.
- Stankovic, M. M., A. R. Nestorovic, A. M. Tomovic, et al. (2009). "TNF-alpha-308 promotor polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer." Neoplasma **56**(4): 348-52.
- Steinkamp, G. and H. von der Hardt (1994). "Improvement of nutritional status and lung function after long-term nocturnal gastrostomy feedings in cystic fibrosis." J Pediatr **124**(2): 244-9.
- Stephanou, A., D. A. Isenberg, S. Akira, et al. (1998). "The nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6) and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) signalling pathways co-operate to mediate the activation of the hsp90beta gene by interleukin-6 but have opposite effects on its inducibility by heat shock." Biochem J **330** (Pt 1): 189-95.
- Stephanou, A. and D. S. Latchman (1999). "Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by STAT family transcription factors." Gene Expr **7**(4-6): 311-9.
- Stuber, F., M. Petersen, F. Bokelmann, et al. (1996). "A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis." Crit Care Med **24**(3): 381-4.
- Sukkar, M. B., L. G. Wood, M. Tooze, et al. (2011). "Soluble RAGE is deficient in neutrophilic asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J.
- Tabary, O., E. Boncoeur, R. de Martin, et al. (2006). "Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells." Cell Signal **18**(5): 652-60.
- Tabary, O., J. M. Zahm, J. Hinnrasky, et al. (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.
- Taccetti, G., S. Campana, F. Festini, et al. (2005). "Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients." Eur Respir J **26**(3): 458-61.

- Taguchi, A., D. C. Blood, G. del Toro, et al. (2000). "Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases." *Nature* **405**(6784): 354-60.
- Tanaka, G., A. J. Sandford, K. Burkett, et al. (2007). "Tumour necrosis factor and lymphotoxin A polymorphisms and lung function in smokers." *Eur Respir J* **29**(1): 34-41.
- Taniguchi, N., K. Kawahara, K. Yone, et al. (2003). "High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine." *Arthritis Rheum* **48**(4): 971-81.
- Taylor, C., C. W. Commander, J. M. Collaco, et al. (2011). "A novel lung disease phenotype adjusted for mortality attrition for cystic fibrosis Genetic modifier studies." *Pediatr Pulmonol* **46**(9): 857-69.
- Temple, S. E., K. Y. Cheong, K. G. Ardlie, et al. (2004). "The septic shock associated HSPA1B1267 polymorphism influences production of HSPA1A and HSPA1B." *Intensive Care Med* **30**(9): 1761-7.
- The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium (1993). "Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis." *N Engl J Med* **329**(18): 1308-13.
- Tirouvanziam, R., S. de Bentzmann, C. Hubeau, et al. (2000). "Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts." *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(2): 121-7.
- Tomaiuolo, R., D. Degiorgio, D. A. Coviello, et al. (2009). "An MBL2 haplotype and ABCB4 variants modulate the risk of liver disease in cystic fibrosis patients: a multicentre study." *Dig Liver Dis* **41**(11): 817-22.
- Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, et al. (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(5): 349-63.
- Toth, E. K., J. Kocsis, B. Madaras, et al. (2007). "The 8.1 ancestral MHC haplotype is strongly associated with colorectal cancer risk." *Int J Cancer* **121**(8): 1744-8.
- Trevisiol, C., M. Boniotto, L. Giglio, et al. (2005). "MBL2 polymorphisms screening in a regional Italian CF Center." *J Cyst Fibros* **4**(3): 189-91.
- Tsai, C. H., K. Y. Tung, C. H. Chen, et al. (2011). "Tumour necrosis factor G-308A polymorphism modifies the effect of home dampness on childhood asthma." *Occup Environ Med* **68**(10): 771-6.
- Tsui, L. C., M. Buchwald, D. Barker, et al. (1985). "Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker." *Science* **230**(4729): 1054-7.
- Uchida, T., M. Shirasawa, L. B. Ware, et al. (2006). "Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury." *Am J Respir Crit Care Med* **173**(9): 1008-15.
- Ueno, H., T. Matsuda, S. Hashimoto, et al. (2004). "Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury." *Am J Respir Crit Care Med* **170**(12): 1310-6.
- Ulfgren, A. K., C. Grundtman, K. Borg, et al. (2004). "Down-regulation of the aberrant expression of the inflammation mediator high mobility group box chromosomal protein 1 in muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis treated with corticosteroids." *Arthritis Rheum* **50**(5): 1586-94.
- van der Doef, H. P., M. G. Sliker, D. Staab, et al. "Association of the CLCA1 p.S357N variant with meconium ileus in European patients with cystic fibrosis." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **50**(3): 347-9.
- Van Goor, F., S. Hadida, P. D. Grootenhuys, et al. (2011). "Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(46): 18843-8.
- Van Molle, W., B. Wielockx, T. Mahieu, et al. (2002). "HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock." *Immunity* **16**(5): 685-95.
- Vandenabeele, P., W. Declercq, R. Beyaert, et al. (1995). "Two tumour necrosis factor receptors: structure and function." *Trends Cell Biol* **5**(10): 392-9.

- Vanscoy, L. L., S. M. Blackman, J. M. Collaco, et al. (2007). "Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **175**(10): 1036-43.
- Vega, V. L., M. Rodriguez-Silva, T. Frey, et al. (2008). "Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages." *J Immunol* **180**(6): 4299-307.
- Vignola, A. M., P. Chanez, B. S. Polla, et al. (1995). "Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis." *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**(6): 683-91.
- Vij, N., S. Mazur and P. L. Zeitlin (2009). "CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response." *PLoS One* **4**(2): e4664.
- Wang, H., O. Bloom, M. Zhang, et al. (1999). "HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice." *Science* **285**(5425): 248-51.
- Wang, H., H. Yang and K. J. Tracey (2004). "Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis." *J Intern Med* **255**(3): 320-31.
- Wang, L. J., L. Lu, F. R. Zhang, et al. (2011). "Increased serum high-mobility group box-1 and cleaved receptor for advanced glycation endproducts levels and decreased endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels in diabetic and non-diabetic patients with heart failure." *Eur J Heart Fail* **13**(4): 440-9.
- Watanabe, T., K. Asai, H. Fujimoto, et al. "Increased levels of HMGB-1 and endogenous secretory RAGE in induced sputum from asthmatic patients." *Respir Med* **105**(4): 519-25.
- Watanabe, T., K. Asai, H. Fujimoto, et al. (2010). "Increased levels of HMGB-1 and endogenous secretory RAGE in induced sputum from asthmatic patients." *Respir Med* **105**(4): 519-25.
- Waterer, G. W., L. ElBahlawan, M. W. Quasney, et al. (2003). "Heat shock protein 70-2+1267 AA homozygotes have an increased risk of septic shock in adults with community-acquired pneumonia." *Crit Care Med* **31**(5): 1367-72.
- Webster, S. J., S. Mruthinti, W. D. Hill, et al. (2012). "An Aqueous Orally Active Vaccine Targeted Against a RAGE/AB Complex as a Novel Therapeutic for Alzheimer's Disease." *Neuromolecular Med*.
- Welch, E. M., E. R. Barton, J. Zhuo, et al. (2007). "PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations." *Nature* **447**(7140): 87-91.
- Wills, P. J., R. L. Hall, W. Chan, et al. (1997). "Sodium chloride increases the ciliary transportability of cystic fibrosis and bronchiectasis sputum on the mucus-depleted bovine trachea." *J Clin Invest* **99**(1): 9-13.
- Wilson, A. G., J. A. Symons, T. L. McDowell, et al. (1997). "Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3195-9.
- Wittkowski, H., A. Sturrock, M. A. van Zoelen, et al. (2007). "Neutrophil-derived S100A12 in acute lung injury and respiratory distress syndrome." *Crit Care Med* **35**(5): 1369-75.
- Wright, F. A., L. J. Strug, V. K. Doshi, et al. (2011). "Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2." *Nat Genet* **43**(6): 539-46.
- Wu, D. Q., J. Liu, X. Y. Lu, et al. (2004). "[The expression of transforming growth factor beta-1 in rat model of chronic obstructive pulmonary disease and the effects of early drugs intervention.]." *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **33**(5): 427-32, 448.
- www.genet.sickkids.on.ca/cftr.
- Xie, J., J. Zhao, C. Xiao, et al. (2010). "Reduced heat shock protein 70 in airway smooth muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Exp Lung Res* **36**(4): 219-26.
- Yamada, S. and I. Maruyama (2007). "HMGB1, a novel inflammatory cytokine." *Clin Chim Acta* **375**(1-2): 36-42.

- Yamakawa, N., T. Uchida, M. A. Matthay, et al. (2011). "Proteolytic release of the receptor for advanced glycation end products from in vitro and in situ alveolar epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **300**(4): L516-25.
- Yan, S. D., X. Chen, J. Fu, et al. (1996). "RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease." Nature **382**(6593): 685-91.
- Yarden, J., D. Radojkovic, K. De Boeck, et al. (2004). "Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype." J Med Genet **41**(8): 629-33.
- Yarden, J., D. Radojkovic, K. De Boeck, et al. (2005). "Association of tumour necrosis factor alpha variants with the CF pulmonary phenotype." Thorax **60**(4): 320-5.
- Yonekura, H., Y. Yamamoto, S. Sakurai, et al. (2003). "Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury." Biochem J **370**(Pt 3): 1097-109.
- Yu, M., H. Wang, A. Ding, et al. (2006). "HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2." Shock **26**(2): 174-9.
- Yung Yu, C., Z. Yang, C. A. Blanchong, et al. (2000). "The human and mouse MHC class III region: a parade of 21 genes at the centromeric segment." Immunol Today **21**(7): 320-8.
- Zemel, B. S., A. F. Jawad, S. FitzSimmons, et al. (2000). "Longitudinal relationship among growth, nutritional status, and pulmonary function in children with cystic fibrosis: analysis of the Cystic Fibrosis Foundation National CF Patient Registry." J Pediatr **137**(3): 374-80.
- Zhang, L., M. Bukulin, E. Kojro, et al. (2008). "Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases." J Biol Chem **283**(51): 35507-16.
- Zhang, Y., J. Zhang, C. Tian, et al. (2011). "The -308 G/A polymorphism in TNF-alpha gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis." J Clin Immunol **31**(2): 174-85.
- Ziegenhagen, M. W., M. E. Rothe, G. Zissel, et al. (2002). "Exaggerated TNFalpha release of alveolar macrophages in corticosteroid resistant sarcoidosis." Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **19**(3): 185-90.
- Zielenski, J. (2000). "Genotype and phenotype in cystic fibrosis." Respiration **67**(2): 117-33.
- Zielenski, J., M. Corey, R. Rozmahel, et al. (1999). "Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13." Nat Genet **22**(2): 128-9.

LISTE DES ABREVIATIONS

A

A : adénosine

ABC : ATP binding cassette

ADN: acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AGE : advanced glycation endproducts

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AP-1: activator protein 1

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP: adénosine triphosphate

B

BPCO : bronchopneumopathie obstructive chronique

C

C: cytosine

Ca: calcium

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

Cl : Chlore

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CRCM: centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose

D

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

DDP: différence de potentiel

Del: délétion

DZ : dizygote

E

ECBC : examen cytobactériologique des crachats

EFR : Explorations Fonctionnelles Respiratoires

ELISA : enzyme- linked immunosorbent assay

ENaC: Epithelial Na Channel, canal sodique

G

G: guanidine

GSH: glutathion

GWAS: genome-wide association study

H

HLA: Human leucocyte antigen

HMGB1: high mobility globulin B 1

HNE: human neutrophil elastase

HSP: Heat Shock Protein

I

IFN- γ : interferon gamma

Ig: immunoglobuline

IL: interleukine

Ins : insertion

IPE : insuffisant pancréatique exocrine

K

K : potassium

Kb : KiloBases

KDa : kilodalton

L

LBA: lavage broncho-alvéolaire

LTA: lymphotoxine A

M

MAP Kinase: mitogen-activated protein kinase

MMP: Matrix metalloproteinase

MZ: monozygote

N

Na: sodium

NBD : nucleotide binding domain

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B

O

ORCC: Outward Rectifying Chloride Channel

P

Pb: paire de base

PCR: Polymerase Chain Reaction

PK: protéine kinase

R

RAGE: Receptor of Advanced Glycation Endproducts

RANKL: receptor-activator of NF- κ B ligand

rhDNase: désoxyribonucléase recombinante humaine

ROMK : Renal Outer Medullary Potassium

ROS: reactive oxygen species

RT : reverse transcription

S

SDRA: syndrome de détresse respiratoire aiguë

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SPE: suffisant pancréatique exocrine

STAT : signal transducer and activator of transcription

T

T: thymidine

TACE: TNF- α -converting enzyme

TGF- β : transforming growth factor beta

TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinase

TIR: Trypsine immune-réactive

TLR: Toll like receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFR: TNF recepteur

TRAIL: TNF-related-apoptosis-inducing ligand

U

U: uridine

V

VEMS: Volume expiré maximal seconde

W

WGA : whole genome analysis

Haplotype ancestral 8.1 dans la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie à transmission autosomique récessive, due à des mutations du gène *CFTR*. Les patients, partageant de mêmes mutations de *CFTR* et un même environnement, ont une expression phénotypique variable, suggérant l'influence d'autres gènes modifiant la sévérité de la maladie, appelés gènes modificateurs. L'atteinte respiratoire, caractérisée par une inflammation exacerbée, est un facteur principal de morbi-mortalité. L'haplotype ancestral AH8.1, impliqué dans la réponse inflammatoire, est constitué de 4 variants : *LTa +252A/G*, *TNF -308G/A*, *HSPA1B +1267A/G* et *AGER -429T/C*. Ainsi, l'objectif était de rechercher une association entre l'haplotype AH8.1 et la sévérité de l'atteinte respiratoire.

Nous avons montré dans une cohorte de 404 patients européens, porteurs de différentes mutations de *CFTR*, que AH8.1 était associé au déclin de la fonction respiratoire. Nous avons taché de répliquer nos résultats dans une cohorte homogène de 1089 patients français, F508del homozygotes, sans succès à ce jour. Nous poursuivons cette étude chez des patients porteurs d'autres mutations de *CFTR*.

Les variants de cet haplotype ont également été étudié séparément. Nous avons ainsi montré que *AGER-429T/C*, non seulement modulait la sévérité de l'atteinte respiratoire, mais, était également associé *in vitro* à une plus grande production de la protéine RAGE.

L'ensemble de ces résultats suggère à ce jour que l'haplotype AH8.1 pourrait moduler la sévérité de l'atteinte respiratoire des patients non homozygotes pour la mutation *CFTR* F508del. De plus, le variant *AGER-429T/C* seul, modulant la sévérité de l'atteinte respiratoire, la protéine RAGE pourrait être envisagée comme biomarqueur dans la mucoviscidose.

Mots clés : mucoviscidose - gène modificateur – haplotype ancestral AH8.1 - RAGE

Ancestral haplotype 8.1 in cystic fibrosis

Cystic fibrosis is an autosomic recessive disease due to mutations in the gene *CFTR*. There is a great phenotypic variability among patients with identical mutations and with identical environment. These data suggest that others genes, called modifier genes, may affect the lung phenotype. Lung disease, characterized by airway inflammation, is a key component of morbi-mortality. The ancestral haplotype AH8.1, involved in the inflammatory response, is composed of 4 variants: *LTa* +252A/G, *TNF* -308G/A, *HSPA1B* +1267A/G and *AGER* -429T/C. The aim of the study was to test whether this haplotype AH8.1 was associated with lung disease severity in cystic fibrosis.

We showed in a cohort of 404 European patients, carriers of different mutations of *CFTR*, that AH8.1 is associated with a greater lung disease severity. We did not succeed to replicate our results in a homogeneous cohort of 1039 French patients F508del homozygotes. We proceed with this study in patients, carriers of other *CFTR* mutations.

Variants of this haplotype were also studied separately. We have shown that *AGER*-429T/C, not only modulates the severity of lung disease, but was also associated in vitro with a greater production of the protein RAGE.

All these results suggest to date that AH8.1 haplotype could modulate the lung disease severity in patients not homozygous for the F508del *CFTR* mutation. Moreover, the variant *AGER*-429T/C modulated the lung disease severity and the protein RAGE may be considered as a biomarker in cystic fibrosis.

Key words: cystic fibrosis - modifier gene - ancestral haplotype AH8.1- RAGE

