



Stimulation de cellules épithéliales bronchiques humaines par la GnRH : effet sur le transport ionique médié par le CFTR

Nathalie Benz

► To cite this version:

Nathalie Benz. Stimulation de cellules épithéliales bronchiques humaines par la GnRH : effet sur le transport ionique médié par le CFTR. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0021 . tel-00952459

HAL Id: tel-00952459

<https://theses.hal.science/tel-00952459>

Submitted on 26 Feb 2014

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.



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie-Santé

École Doctorale "Santé, Information, Communication,
Mathématiques, Matière" (ED SICMA 373)

présentée par

Nathalie BENZ

Préparée à l'Institut national de la santé et de
la recherche médicale, UMR 1078, Génétique,
Génomique Fonctionnelle et Biotechnologies

Stimulation de cellules épithéliales bronchiques humaines par la GnRH : effet sur le transport ionique médié par le CFTR

Thèse soutenue le 13 décembre 2013

devant le jury composé de :

Pierre LEHN

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Président*
(Inserm UMR 1078)

Mohamed BENHAROUGA

Docteur, Université Joseph Fourier (Grenoble I) / *Rapporteur*
(CEA, IRTSV UMR 5249)

Mario OLLERO

Professeur, Université Paris Est Créteil Val de Marne / *Rapporteur*
(IMRB, Inserm U955)

Christelle CORAUX

Docteur, Université de Reims Champagne-Ardenne / *Examineur*
(Inserm UMR-S 903)

Claude FÉREC

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Directeur de thèse*
(Inserm UMR1078)

Pascal TROUVÉ

Docteur, Université de Bretagne Occidentale / *Invité*
(Inserm UMR1078)

Je suis très reconnaissante et honorée que le Professeur Mario Ollero ainsi que le Docteur Mohamed Benharouga aient accepté tous deux de rapporter ce travail. Je remercie également vivement le Docteur Christelle Coraux pour sa participation à mon jury de thèse en tant qu'examinatrice. Enfin, j'exprime mon profond respect et mes remerciements au Professeur Pierre Lehn qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie très sincèrement le Professeur Claude Férec pour l'opportunité qu'il m'a offerte de travailler dans son unité de recherche et pour la confiance qu'il m'a accordée depuis mon arrivée.

J'exprime également ma profonde reconnaissance à l'Association Gaétan Saleün et à son Président, Monsieur René Vigouroux, pour leur soutien financier et leur dévouement exceptionnel au service de la recherche sur les maladies génétiques. J'associe à ces remerciements Marie-Aude Choquet pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Docteur Pascal Trouvé pour avoir cru en moi dès la fin de mon stage de Master professionnel, en me proposant de rejoindre son équipe en tant qu'ingénieur d'études. Pascal, j'aimerais te remercier de m'avoir ensuite guidée tout au long de ce travail de thèse et pour ce projet que tu m'as confié. Merci pour ton aide, ta patience, tes conseils avisés et ta disponibilité.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur Caroline Norez pour sa contribution à ce projet et ses compétences scientifiques de grande qualité. Je remercie le Professeur Frédéric Becq de m'avoir permis de séjourner quelques jours dans son laboratoire. Merci au Docteur Clarisse Vandebrouck pour ses précieux conseils. Enfin, un grand merci à Laura Vachel pour son accueil et son aide, lesquels ont rendu ce séjour très enrichissant, tant d'un point de vue professionnel qu'amical. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite de ta thèse.

Je tiens également à remercier Messieurs Gérard Sinquin et Philippe Eliès pour les multiples séances passées devant le microscope confocal, nécessaires pour mener à bien ce travail. Merci pour votre gentillesse.

J'exprime bien évidemment toute ma sympathie à l'ensemble des membres de l'UMR 1078 qui m'ont aidée et accompagnée tout au long de ma thèse, avec une petite mention particulière pour :

Sophie, tes compétences techniques, ta bonne humeur et ton extrême disponibilité m'ont été d'une aide si précieuse. Merci pour l'intérêt que tu portes à ce projet.

Mathieu, je te remercie de m'avoir initiée aux joies de la microcytofluorométrie dynamique ainsi que pour ta gentillesse et ta contribution à ce projet.

Rozenn, tu sais si souvent trouver les mots pour remonter le moral des troupes. Merci pour ton soutien, ton dynamisme et pour les dernières nouvelles fraîches du labo.

Stéphanie, j'imagine que le gène CFTR n'a plus de secret pour toi. Je suis très heureuse d'avoir pu partager tous ces congrès avec toi, quelques fois accompagnés de petites péripéties. Merci pour tes conseils, ton rire communicatif et pour nos petites sessions « forum aquariophilie ». Je te souhaite bon courage pour cette dernière ligne droite.

Marie-Lise, ton calme et la dextérité avec laquelle tu manipules ces petits hémisphères cérébraux murins m'impressionnent. Merci pour toutes nos discussions sportives enflammées.

Chandran, en plus de tes grandes connaissances scientifiques, on peut toujours compter sur toi pour un quelconque ennui informatique. Merci pour ton accueil chaleureux lors de mon arrivée au laboratoire, pour ta générosité et toute l'aide que tu as pu m'apporter.

Marie-Laure, ce fut pour moi un immense plaisir de t'accompagner pour tes premiers pas dans le monde de la recherche. Cette collaboration ne s'arrête pas là puisque nous allons encore parcourir un petit bout de chemin ensemble. Je te souhaite plein de réussite pour cette thèse qui commence.

Je n'oublie pas non plus Sylvia, Marine et Manu ainsi que tous mes anciens camarades doctorants, Julie, Ling, Yizhen, Mattias, Pierrick et notre cher Docteur B., partis pour de nouvelles aventures à travers le monde. Merci pour votre gentillesse, les discussions passionnantes, scientifiques ou non, et pour les grands moments partagés avec vous.

Plus personnellement, je tiens à remercier les Docteurs Jean-Pascal Schwartz et Guy-Dominique Lample pour m'avoir accompagnée, à leur façon, tout au long de ma thèse.

Je remercie mes parents et mes grands-parents pour leur soutien et la confiance qu'ils m'ont témoignée. Merci Papa pour tes conseils en jardinage. Je ne suis pas encore devenue une vraie main verte mais ces moments passés en compagnie des gastéropodes, des insectes et autres lombrics m'ont permis de m'évader quelques instants. Merci ma p'tite Mamie pour ta grande curiosité, c'est toujours un véritable plaisir de discuter avec toi.

Je tiens également à remercier très chaleureusement mes sœurs, Valérie, pour son oreille attentive, et Frédérique, pour son léger grain de folie. Je tairai bien entendu vos petits surnoms mais pas mon extrême reconnaissance pour votre soutien sans faille et tout l'amour que vous me donnez. Merci à toutes les deux d'être toujours là pour moi.

Enfin, je remercie Jean-Marie pour sa patience, sa gentillesse et son esprit critique. J'imagine qu'il n'a pas dû être facile tous les jours de partager la vie d'une doctorante souvent stressée et en proie au doute. Merci également pour toutes les connaissances agrémentées de rythmiques entêtantes que tu m'apportes tous les jours. Je te souhaite plein de réussite pour ton nouveau projet professionnel ainsi qu'une très longue vie scénique à Ginkgo.

Sans oublier Adeline, Julie et Léna. Tout simplement merci pour tous ces agréables moments passés avec vous.

Résumé

Stimulation de cellules épithéliales bronchiques humaines par la GnRH : effet sur le transport ionique médié par la protéine CFTR

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomale récessive causée par des mutations dans le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Ce dernier code un canal chlorure AMPc-dépendant localisé dans la membrane apicale des cellules épithéliales, dont l'activité est régulée par de nombreuses interactions protéine-protéine. Dans le cadre de la recherche de nouveaux partenaires du CFTR, une interaction directe entre le canal (sauvage et muté F508del) et l'annexine A5 (AnxA5) a été mise en évidence dans notre laboratoire. Des stratégies de sur et de sous-expression nous ont également permis d'établir un lien fonctionnel entre les deux protéines. En effet, nos travaux montrent que les sécrétions ioniques dépendantes du CFTR sont corrélées au niveau d'expression intracellulaire de l'AnxA5. Par ailleurs, une élévation des courants médiés par le CFTR ainsi qu'une augmentation de la quantité de canaux dans la membrane plasmique sont observées suite à la surexpression de l'AnxA5 dans des cellules exprimant le CFTR muté F508del.

Au vu de ces observations, l'AnxA5 apparaît comme une cible potentielle pour la correction de certains défauts engendrés par la mutation F508del. Une piste thérapeutique pourrait être l'identification de composés capables d'augmenter son expression dans des cellules épithéliales exprimant le mutant F508del de la protéine CFTR. Considérant les informations fournies par la littérature, notre choix s'est porté sur la GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*), molécule utilisée en thérapeutique humaine depuis plus de 25 ans. Ainsi, nous avons évalué l'effet de la GnRH sur la modulation de l'expression de l'AnxA5 et sur le transport ionique dépendant du CFTR dans nos différents modèles d'étude.

Outre la présence du récepteur de la GnRH dans nos modèles cellulaires, nous montrons également que l'expression de l'AnxA5 y est augmentée dès 60 minutes de traitement avec l'hormone (1 nM). De plus, comparativement à des cellules non stimulées, des cellules prétraitées avec la GnRH présentent une hausse significative des sorties actives d'iode, corrélant avec une augmentation de la quantité de CFTR à la surface cellulaire. Ces observations ont été faites dans les modèles exprimant le CFTR muté F508del ainsi que dans ceux exprimant le CFTR sauvage.

Dans nos modèles et selon nos conditions de stimulation, un traitement avec la GnRH augmente l'expression intracellulaire de l'AnxA5 et conduit à une élévation des sécrétions ioniques médiées par le canal CFTR. Néanmoins, au vu de la multitude de voies de signalisation susceptibles d'être activées et de gènes pouvant être régulés suite à la liaison de la GnRH sur son récepteur, l'effet observé sur l'AnxA5 ne représente probablement pas le seul évènement cellulaire à l'origine de l'impact positif enregistré sur l'activité du canal CFTR.

Mots clés : CFTR, mutation F508del, transport ionique, AnxA5, GnRH, récepteur de la GnRH

Abstract

Stimulation of human bronchial epithelial cells by GnRH : effect on CFTR-mediated ion transport

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, which encodes a cAMP-stimulated chloride channel. CFTR is primarily located at the apical surface of epithelial cells, where its activity is regulated by some protein-protein interactions. As part of new CFTR's partners research, we previously showed that annexin A5 (AnxA5) binds directly to both normal and F508del-CFTR. Moreover, under and overexpression strategies led us to establish a functional link between these two proteins. In fact, CFTR-dependent ion secretions are correlated to the intracellular level of AnxA5. Otherwise, in transfected epithelial cells, AnxA5 overexpression increases CFTR's level in plasma membranes and raises CFTR-mediated currents in F508del-CFTR expressing cells.

In the light of these findings, AnxA5 appears as a potential target in order to correct some defects caused by the F508del mutation. A therapeutic approach would be to find some compounds capable of increasing AnxA5 expression in F508del-CFTR expressing epithelial cells. Reviewing the literature, our choice fell on GnRH (gonadotropin-releasing hormone), a commonly used molecule for diverse clinical applications for 25 years. So, the effects of GnRH on the modulation of AnxA5 expression and on CFTR-dependent ion transport were assessed in our different cellular models.

Beside the GnRH receptor expression, we show that AnxA5 expression is augmented in all cell lines after one hour incubation with the hormone (1 nM). Moreover, compared to untreated cells, a significant iodide efflux peak is measured in GnRH pretreated cells, which is correlated with an increased cell surface expression of CFTR. It is of interest to note that these observations have been made in CF and non-CF cells.

In our models and according to our stimulation conditions, GnRH treatment enhances AnxA5 intracellular expression and leads to a rise of CFTR-dependent ion secretions. Nevertheless, given the multitude of activated signaling pathways and regulated genes in response to GnRH binding to its receptor, the positive impact on CFTR activity is probably not solely explained by the effect on AnxA5 expression.

Keywords : CFTR, F508del mutation, ion transport, AnxA5, GnRH, GnRH receptor

Table des matières

Abréviations et Sigles	11
Liste des figures	16
Liste des tableaux	18
Liste des modèles cellulaires	19

INTRODUCTION..... 21

Partie 1. Contexte physiopathologique : la mucoviscidose.....22

1. Les transports épithéliaux : généralités	22
2. Historique et épidémiologie de la mucoviscidose	23
2.1. Histoire de la maladie	23
2.2. Quelques données épidémiologiques	24
3. Les différentes manifestations de la maladie	24
3.1. Atteintes des voies respiratoires	25
3.2. Atteintes digestives (hépatobiliaires, pancréatiques et gastro-intestinales)	26
3.3. Atteintes du tractus génital	27
3.4. Autres atteintes possibles	27
4. Dépistage et diagnostic de la mucoviscidose	28
4.1. Dépistage néonatal	28
4.2. Principaux tests utilisés dans le diagnostic de la mucoviscidose	28
4.2.1. Le test de la sueur	28
4.2.2. Mesure de la différence de potentiel transépithéliale nasale	29
4.3. Le diagnostic prénatal	29
5. La prise en charge actuelle de la maladie	29

Partie 2. Le canal CFTR : du gène à la protéine.....31

1. Le gène CFTR et son expression	31
1.1. Identification du gène CFTR.....	31
1.2. Régulation spatio-temporelle du gène CFTR	31
2. Les anomalies moléculaires du gène CFTR.....	32
2.1. Les différents types de mutations.....	32
2.2. Les différentes classes de mutations	32
2.3. Les relations génotype-phénotype	34
3. Structure de la protéine CFTR.....	35
3.1. Les transporteurs ABC.....	35
3.1.1. Généralités	35
3.1.2. Topologie générale des transporteurs ABC.....	36
3.2. Les différents domaines de la protéine CFTR.....	36
3.2.1. Les domaines transmembranaires (TMDs).....	37
a. Structure.....	37
b. Le pore du canal CFTR.....	37
3.2.2. Les boucles extracellulaires et intracytoplasmiques	38
a. Les boucles extracellulaires	38
b. Les boucles intracytoplasmiques	38
3.2.3. Les domaines de liaison aux nucléotides (NBDs).....	39
a. Structure et séquences consensus	39
b. Fonction des NBDs	39
3.2.4. Le domaine régulateur (domaine R)	40

a. Structure du domaine R	41
b. Sites de phosphorylation	41
3.2.5. Les extrémités de la protéine CFTR	42
a. L'extrémité N-terminale	42
b. L'extrémité C-terminale	42
3.2.6. Structure quaternaire de la protéine CFTR.....	42
3.2.7. Modélisation tridimensionnelle de la protéine CFTR.....	43
4. Le CFTR, une protéine multifonctionnelle.....	43
4.1. Le CFTR : un canal ionique aux perméabilités nombreuses	44
4.1.1. Propriétés et modalités d'activation et de désactivation du canal	44
a. Propriétés du canal	44
b. De la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP dépend l'ouverture et la fermeture du canal CFTR.....	44
c. Le processus de phosphorylation du canal CFTR.....	46
d. Désactivation du CFTR par les phosphatases et le rôle joué par les seconds messagers	48
4.1.2. Autres types de perméabilité	49
a. Perméabilité aux anions polyatomiques	49
b. Perméabilité au glutathion	49
4.1.3. Le CFTR et le transport d'ATP.....	50
4.2. Le CFTR : une protéine régulatrice de canaux ioniques et transporteurs	50
4.2.1. Le CFTR et les canaux chlorure (TMEM16A/F).....	51
a. CFTR et ORCCs (TMEM16F)	51
b. CFTR et CaCCs (TMEM16A).....	51
4.2.2. Le CFTR et le canal potassique ROMK.....	52
4.2.3. Le CFTR et le canal sodique ENaC.....	53
4.2.4. Le CFTR et le canal calcique TRPC6.....	54
4.2.5. Le CFTR et les échangeurs Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	55
4.2.6. Le CFTR et les aquaporines.....	55
4.3. Autres fonctions du CFTR.....	56
4.3.1. Régulation du pH.....	56
4.3.2. Rôle dans l'inflammation.....	57
5. La voie de sécrétion de la protéine CFTR : du RE à la membrane apicale	58
5.1. Biosynthèse de la protéine CFTR : étapes précoces de la voie de sécrétion	58
5.1.1. Assemblage et glycosylation de la protéine CFTR	59
a. Un assemblage « coopératif » des domaines de la protéine CFTR	59
b. La N-glycosylation de la protéine CFTR.....	59
c. La biosynthèse de la protéine CFTR : un processus peu efficace.....	60
5.1.2. Le contrôle de l'état de conformation du CFTR naissant et néo-synthétisé.....	61
a. Le repliement séquentiel du CFTR assisté par les chaperonnes moléculaires	61
b. La dégradation ubiquitine-dépendante des précurseurs mal conformés	62
5.1.3. Le transport du CFTR entre le RE et l'appareil de Golgi.....	62
5.2. La protéine CFTR dans les compartiments post-golgien et apical	63
5.2.1. Les protéines SNARE et les filamines : mobilisation de l'extrémité N-terminale.....	63
a. Les protéines SNARE	63
b. Les filamines	64
5.2.2. Les protéines à domaine PDZ : mobilisation de l'extrémité C-terminale.....	65
a. Généralités sur les domaines PDZ.....	65
b. CFTR et les NHERFs (NHERF1 et NHERF2).....	65
c. CFTR et CAL.....	68
d. CFTR et les GRASPs.....	68
5.2.3. Autres protéines impliquées dans le trafic apical de la protéine CFTR.....	69
a. Protéines accompagnant le CFTR pendant son endocytose clathrine-dépendante.....	69
b. Protéines accompagnant le CFTR au cours de son recyclage à la surface cellulaire	70
6. Les conséquences engendrées par la mutation F508del sur la protéine CFTR	71
6.1. Localisation cellulaire de la protéine CFTR-F508del.....	71
6.2. Défauts intradomains (NBD1) et intramoléculaires (CFTR) conférés par la perte du résidu F508	73
6.3. La protéine CFTR-F508del et les chaperons moléculaires	74
6.4. Comportement du canal CFTR-F508del à la membrane plasmique	76
6.4.1. Défaut fonctionnel.....	76
6.4.2. Instabilité à la surface cellulaire	76
7. La recherche et le développement de stratégies thérapeutiques	78
7.1. Des stratégies adaptées à chaque classe de mutations	79
7.1.1. Translecture de codons stop prématurés : mutations de classe I.....	79

7.1.2. Identification de correcteurs promouvant l'adressage à la membrane de protéines mutées présentant un défaut de maturation conformationnelle : mutations de classe II	79
a. Avant-propos : différentes pistes pour restaurer le CFTR-F508del à la surface cellulaire.....	80
b. Modulation de l'expression et de l'activité des chaperons moléculaires.....	80
c. Les correcteurs qui interagissent directement avec le CFTR-F508del	82
7.1.3. Identification de potentioteurs améliorant l'activité des protéines CFTR mutées présentant un défaut fonctionnel : mutations de classe II et classe III.....	83
7.1.4. Thérapies combinées et molécules à double activité : mutations de classe II	84
a. Combinaison de molécules actives	84
b. Molécules à double activité	85
7.2. Autres stratégies thérapeutiques.....	85
7.2.1. La thérapie génique.....	85
7.2.2. Modulation des voies de transport ionique parallèles	86
8. Conclusion : le CFTR, toujours en quête de protéines partenaires	86

Partie 3. Les annexines88

1. Présentation générale : découverte, définition et nomenclature	88
2. Structure et propriétés des annexines	89
2.1. Structure des annexines de vertébrés.....	89
2.1.1. Le domaine C-terminal : « cœur » de l'annexine	89
a. Généralités.....	89
b. Les sites de liaison aux ions calcium.....	90
2.1.2. Le domaine N-terminal : propre à chaque annexine.....	90
a. Généralités.....	90
b. Le domaine N-terminal : siège de modifications post-traductionnelles.....	91
2.2. Propriétés des annexines de vertébrés.....	91
2.2.1. Liaison aux phospholipides membranaires.....	91
a. Liaison aux phospholipides dépendante du calcium	91
b. Agrégation de membranes	93
c. Liaison aux phospholipides indépendante du calcium.....	93
2.2.2. La liaison aux protéines du cytosquelette.....	94
2.2.3. La liaison aux protéines S100.....	94
2.2.4. Formation de canaux calciques	95
2.2.5. Autres partenaires et propriétés connus de l'AnxA5.....	96
a. les phospholipases : PLA ₂ et PLC.....	96
b. la PKC δ	96
c. l'échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺ et la calvéoline-3.....	96
d. la protéine CFTR.....	97
e. le collagène.....	97
f. propriété d'auto-assemblage de l'AnxA5.....	97
2.3. Synthèse des caractéristiques structurales et des principales propriétés de l'AnxA5	97
3. Distribution cellulaire et tissulaire des annexines	99
4. Les différentes fonctions des annexines.....	100
4.1. Dans le trafic et l'organisation des membranes cellulaires.....	100
4.1.1. La mise en place de la polarité des cellules épithéliales.....	100
4.1.2. L'exocytose.....	100
4.1.3. L'endocytose.....	101
4.1.4. La phagocytose	101
4.2. La régulation de canaux ioniques par les annexines.....	102
4.3. Autres rôles fonctionnels décrits pour l'AnxA5.....	102
4.3.1. Implication dans la minéralisation du cartilage de croissance.....	102
4.3.2. Implication dans le processus de réparation des membranes cellulaires	104
4.4. Les fonctions extracellulaires des annexines	104
4.4.1. Rôle dans l'inflammation.....	105
4.4.2. Rôle dans la coagulation sanguine.....	105
4.4.3. Autres rôles de l'AnxA5 extracellulaire	105
a. un nouveau sentier de l'endocytose induit par l'AnxA5.....	105
b. rôle à la surface des cellules apoptotiques.....	106
c. applications biotechnologiques de l'AnxA5.....	107
4.5. Synthèse des principales activités intracellulaires et extracellulaires décrites pour l'AnxA5	107

5. Les annexines et la protéine CFTR : les origines du projet	107
---	-----

Partie 4. La GnRH et son récepteur (RGnRH)117

1. Physiologie de l'axe hypothalamo-hypophysaire	117
1.1. La GnRH de mammifères.....	117
1.1.1. Structure et biosynthèse	118
1.1.2. Sécrétion pulsatile et régulée de la GnRH.....	118
a. Facteurs périphériques : stéroïdes sexuels.....	119
b. Facteurs centraux : neurotransmetteurs.....	119
1.2. Le récepteur de la GnRH (RGnRH)	119
1.2.1. Structure du RGnRH.....	119
1.2.2. Régulation transcriptionnelle du RGnRH	120
1.2.3. Signalisation et désensibilisation du RGnRH.....	120
a. Voies de signalisation associées au RGnRH	120
b. Désensibilisation du RGnRH.....	121
1.3. Le système GnRH de type II	121
2. Présence du RGnRH hors de l'hypophyse	122
3. L'utilisation de la GnRH en thérapeutique humaine.....	126
3.1. Le développement des analogues de la GnRH.....	126
3.2. Les principaux effets secondaires rencontrés	127
3.3. Applications thérapeutiques des analogues de la GnRH	127
3.3.1. Pathologies hormono-dépendantes	127
a. via une action indirecte des analogues	127
b. via une action directe des analogues	128
3.3.2. Pathologies hormono-indépendantes	128
3.3.3. Activité anti-tumorale des ligands	129
3.3.4. Conclusion	129

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 131

Partie 1. Contexte de l'étude.....132

1. Découverte de l'interaction CFTR-AnxA5 et répercussion sur le transport ionique médié par le canal CFTR..	132
2. <u>Article 1</u> . Conséquences de la modulation de l'expression de l'AnxA5 dans des cellules exprimant le CFTR-F508del.....	134
2.1. Modèles d'étude : lignée A549 exprimant le CFTR-F508del (transfection stable).....	134
2.2. Modèle d'étude : lignée CFBE41o- exprimant le CFTR-F508del (expression endogène).....	134
2.3. Article 1. « Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the F508del-CFTR »	135
3. Mise en place du projet de recherche.....	145
4. La GnRH : un candidat potentiel pour augmenter l'expression de l'AnxA5 ?.....	145

Partie 2. Objectifs et déroulement de l'étude147

RÉSULTATS 148

<u>Article 2</u> . Stimulation de cellules épithéliales bronchiques humaines par la GnRH : conséquences sur l'expression de l'AnxA5 et sur le transport ionique médié par la protéine CFTR	149
--	-----

CONCLUSION GÉNÉRALE - Discussion et Perspectives 180

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 188

CURRICULUM VITAE ET TRAVAUX..... 230

Abréviations et Sigles

aa	acides aminés	CAP70	<i>CFTR-associated protein of 70 kDa</i>
AATs	aminoarylthiazoles	cc	coiled-coil
AAV	virus adéno-associés (<i>adeno-associated virus</i>)	CCP	puit recouvert de clathrine (<i>clathrin-coated pit</i>)
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>	CCV	<i>clathrin-coated vesicle</i>
Ac	anticorps	CF	<i>cystic fibrosis</i>
AC	adénylate cyclase	CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
ADN	acide déoxyribonucléique	CFTR_{inh172}	inhibiteur du CFTR
ADNc	ADN complémentaire	CFTR-RD	<i>CFTR-related disorder</i>
ADP	adénosine diphosphate	CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
Aha1	<i>activator of Hsp90 ATPase homologue 1</i>	CH₃CO₂⁻	ion acétate
AKAPs	<i>A-kinase anchoring proteins</i>	CHIP	<i>C-terminus of Hsc70-interacting protein</i>
AMPc	adénosine monophosphate cyclique	CHOP	<i>C/EBP-homologous protein</i>
AMPK	protéine kinase activée par l'AMP (<i>AMP-activated protein kinase</i>)	CIP	<i>CFTR interacting protein</i>
AMP-PNP	<i>adenylyl imidodiphosphate</i>	CK2	<i>caseine kinase 2</i>
ANO1	anoctamine-1	Cl⁻	ion chlorure
Anx	annexine (AnxA5 : annexine A5)	COMMD1	<i>copper metabolism(Murr1) domain containing1</i>
AON	oligonucléotides antisens (<i>antisense oligonucleotides</i>)	CNX	calnexine
AP-2	<i>adaptor protein complex 2</i>	co-IP	co-immunoprécipitation
AQP	aquaporines	COPI/II	<i>coat protein complex I, II</i>
ARN	acide ribonucléique	CortBP1	<i>cortactin-binding protein 1</i>
ARNm	ARN messager	CPA	acide cyclopiazonique
ASL	liquide de surface des voies aériennes (<i>airway surface liquid</i>)	CPX	8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
ATF4/6	<i>activating transcription factor 4, 6</i>	CRACM1	<i>calcium release-activated calcium modulator1</i>
ATP	adénosine triphosphate	CRCM	Centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose
Bag1	<i>Bcl2-associated athanogene 1</i>	CREB	<i>cAMP response element binding</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>	C-ter	C-terminale
Br⁻	ion bromure	Cxs	connexines
β2-AR	récepteur β2-adrénérique	Dab2	<i>Disabled-2</i>
Ca²⁺	ion calcium	DAG	diacyl glycérol
CaCC	calcium (Ca ²⁺)-activated chloride channel	DBHQ	2',5'-di(ter-butyl)-1,4-benzohydroquinone
CAL	<i>CFTR-associated ligand</i>	ddp	différence de potentiel
CaM	calmoduline	DMSO	diméthylsulfoxyde
CaMK	protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline-dépendante	DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
CaN	calcineurine	DSG	déoxyspergualine
		2D/3D	bidimensionnel, tridimensionnel

2D-DIGE	<i>2D-differential in-gel electrophoresis</i>	GADD	<i>growth arrest- and DNA damage-inducible</i>
EAE	encéphalomyélite auto-immune expérimentale	GAP	<i>GnRH-associated peptide</i>
EBP50	<i>erzin-radixin-moesin binding phosphoprotein-50</i>	GAPs	<i>GTPase-activating proteins</i>
EC	extracellulaire	GC	guanylate cyclase
ECLs	boucles extracellulaires (<i>extra-cellular loops</i>)	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
EDEM	<i>ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein</i>	Glc	glucose
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique	GlcNAc	N-acétylglucosamines
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	GMPc	guanosine monophosphate cyclique
EGFR	récepteur à l'EGF (<i>epidermal growth factor receptor</i>)	GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
Egr1	<i>early growth response gene 1</i>	cGnRH	<i>chicken GnRH</i>
EGTA	acide glycol diamine tétra-acétique	GOPC	<i>Golgi-associated PDZ and coiled-coil domain containing protein</i>
ELAD	<i>endolysosomal-associated degradation</i>	GPR54	<i>KISS1-derived peptide receptor</i>
ENaC	<i>epithelial sodium (Na⁺) channel</i>	GRASP	<i>Golgi reassembly stacking protein</i>
ER (α, β)	récepteurs aux œstrogènes (alpha, bêta) (<i>estrogen receptors</i>)	GRP	<i>gastrin-releasing peptide</i>
ER	endoplasmic reticulum	GRP78/94	<i>glucose-regulated protein, 78 or 94 kDa</i>
ERQC	contrôle de qualité du RE (<i>endoplasmic reticulum quality control</i>)	GSH	gluthation
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>	Gst	génistéine
ERCs	<i>endosomal recycling compartments</i>	αGSU	<i>alpha-glycoprotein hormone subunit</i>
ERSE	<i>ER stress response element</i>	GTP	guanosine triphosphate
ERM	erzine-radixine-moésine	G3PDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>	HA	<i>Haemophilus influenza (H. influenzae)</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complexes required for transport</i>	HAE	<i>human airway epithelial</i>
E3KARP	<i>NHE3 kinase A regulatory protein</i>	Hb-EGF	<i>heparin-binding EGF</i>
F⁻	ion fluorure	hCG	hormone chorionique gonadotrope
FC	<i>fold change</i>	HCO₂⁻	ion formate
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	HCO₃⁻	ion bicarbonate
FKBP	<i>FK506-binding protein</i>	Hdj-1/-2	<i>Human DnaJ homologue 1 & 2</i>
FLNs	filamines	HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>	HHG	hypothalamo-hypophyso-gonadique
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i>	Hop	<i>Hsc70/Hsp90-organizing protein</i>
FSHβ	sous-unité β spécifique à la FSH	Hsc70	protéine de choc thermique (<i>heat shock cognate protein 70</i>)
Fsk	forskoline	Hsp70/90	protéine de choc thermique (<i>heat shock protein 70 or 90</i>)
Gαi,q,s	protéine G (sous-unités αi, αq, αs)	HTS	criblage à haut débit (<i>high-throughput screening</i>)
GABA	acide γ-aminobutyrique	I⁻	ion iodure
		IBMX	<i>3-isobutyl-1-methylxanthine</i>

IC	intracellulaire / insuffisance cardiaque	Myr	myristoylation
ICC	immunocytochimie	Na⁺	ion sodium
ICLs	boucles intracytoplasmiques (<i>intra-cellular loops</i>)	NB-DNJ	<i>N-butyldioxynojirimycin</i>
IFN-γ	interféron-gamma	NBDs	domaines de liaison aux nucléotides (<i>nucleotide binding domains</i>)
IHC	immunohistochimie	NDPK	<i>nucleoside diphosphate kinase</i>
IKEEP	<i>intestinal and kidney-enriched PDZ protein</i>	NEBs	corps neuro-épithéliaux (<i>neuroepithelial bodies</i>)
IL-1βR	<i>interleukin-1 receptor</i>	NF-κB	<i>nuclear factor kappa-B</i>
IP	insuffisance pancréatique	NHE3	<i>Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3</i>
IP3	inositol 1,4,5-triphosphate	NHERFs	<i>Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factors</i>
IP3R	récepteur à l'IP3	NKCC	cotransporteur Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻
IRBT	<i>IP3-receptor binding protein</i>	NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
IRE1	<i>inositol requiring 1</i>	NO₃⁻	ion nitrate
Isc	courant de court-circuit	NO	monoxyde d'azote (<i>nitric oxide</i>)
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>	NOS-I	NO synthase neuronale
K8	kératine 8	N-ter	N-terminale
K⁺	ion potassium	N-WASP	<i>neural Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
kb	kilobase	ORCC	<i>outwardly rectifying chloride channel</i>
K_d	constant de dissociation	PA ou PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>) acide phosphatidique
kDa	kilodalton	PAP I	<i>Placental Anticoagulant Protein I</i>
LB	lame basale	4-PBA	4-phénylbutyrate de sodium
LH	<i>luteinizing hormone</i>	PCL	liquide périciliaire (<i>periciliary liquid</i>)
LHβ	sous-unité β spécifique à la LH	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
LHRH	<i>luteinizing hormone-releasing hormone</i>	P-dATP	<i>N6-(2-phenylethyl)-2'-deoxy-ATP</i>
LPAs	acides lysophosphatidiques	PDEs	inhibiteur des phosphodiesterases (<i>phosphodiesterase inhibitors</i>)
LPA₂	récepteur de l'acide lysophosphatidique de type 2	PDI	protéine disulfure isomérase (<i>protein disulfide isomerase</i>)
LR	récepteur de la laminine (<i>laminin receptor</i>)	PDZK1	<i>PDZ domain-containing protein in kidney 1</i>
Man	mannose	PDZK2	<i>intestinal and kidney-enriched PDZ protein</i>
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinases</i>	PE	phosphatidyléthanolamine
MVBs	corps multi-vésiculaires (<i>multivesicular bodies</i>)	PERK	<i>PKR like endoplasmic reticulum kinase</i>
MERM	merline-erzine-radixine-moésine	P-gp	glycoprotéine P
Mg²⁺	ion magnésium	Pi	phosphate inorganique
MMPs	métalloprotéases matricielles (<i>matrix metalloproteinases</i>)	PI	phosphatidylinositol
MP	membrane plasmique	PI/PS	<i>pancreatic insufficiency/pancreatic sufficiency</i>
MPB	benzo[c]quinolizinium	PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
MRP1	<i>multidrug resistance-associated protein</i>		
MSDs	<i>membrane spanning domains</i>		

PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase	Shank2	<i>Src homology 3 and ankyrin repeats-containing protein 2</i>
PKA/PKC	protéine kinase A / C	shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
(c/n)PKC	PKC conventionnelle / nouvelle	SH3	<i>Src-homology-3</i>
PLA₂	phospholipase A2	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
PLC	phospholipase C	SLC26	<i>solute carrier 26</i>
PLCβ	phospholipase bêta	SNAP-23	<i>synaptosome-associated protein, 23 kDa</i>
(c)PLA₂	PLA ₂ cytosolique	SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
hPLAP	<i>human placental alkaline phosphatase</i>	t/v-SNARE	<i>target/vesicle associated-SNARE</i>
PMNs	polymorphonucléaires	SNC	système nerveux central
PNECs	cellules neuroendocrines pulmonaires (<i>pulmonary neuroendocrine cells</i>)	SNP	système nerveux périphérique
Po	probabilité d'ouverture	SOID	syndrome d'obstruction intestinale distale
Ppi	pyrophosphate	SPQ	<i>6-methoxy-N-(3-sulfopropyl) quinolinium</i>
PPQC	<i>peripheral protein quality control</i>	SPR	résonance plasmonique de surface (<i>surface plasmon resonance</i>)
PP2A/2C	protéines phosphatases 2, groupe A et C	SRP	<i>signal recognition particle</i>
pS	picosiemens	STAS	<i>sulfate transporter antagonist of anti-sigma factor</i>
PS	phosphatidylsérine	S1P/S2P	<i>site 1 & 2 protease</i>
PV	périvasculaire	TASK	<i>two-pore acid-sensitive potassium channel</i>
P2Y_{2/6}	récepteurs purinergiques	TBB	tétrabromobenzotriazole
RACK1	<i>receptor for activated C kinase</i>	Tg	thapsigargine
RCPG	récepteur couplé aux protéines G	TGFβ1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
RD	domaine régulateur (<i>regulatory domain</i>)	TGN	réseau <i>trans</i> -golgien (<i>trans-Golgi network</i>)
RE	réticulum endoplasmique (<i>endoplasmic reticulum</i>)	TIMPs	inhibiteurs tissu spécifique des MMPs (<i>tissue-specific inhibitor of MMPs</i>)
RFM	Registre français de la mucoviscidose	TIR	trypsine immuno-réactive
RGnRH	récepteur de la GnRH	TIRF	<i>total internal reflexion fluorescence microscopy</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	TLR	<i>toll like receptor</i>
RNC	<i>ribosome nascent chain complex</i>	TMs	transmembranaires
ROMK	<i>renal outer medullary potassium</i>	TMDs	domaines transmembranaires (<i>transmembrane domains</i>)
ROS	espèces réactives de l'oxygène (<i>reactive oxygene species</i>)	TMEM16A	<i>transmembrane protein 16A</i>
RTC	<i>ribosome translocon complex</i>	TMEM16F	<i>transmembrane protein 16F</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription-PCR</i>	TNFα	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
RTK	récepteur à activité tyrosine kinase	TNFR1	récepteur au TNF α
SA	<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	TPA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
SAM	<i>sterile alpha motif</i>	tPA	activateur tissulaire du plasminogène
SCN⁻	ion thiocyanate	TRP	<i>transient receptor potentiel</i>
SERCA	<i>serco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase</i>		

TRPC	<i>transient receptor potentiel canonical</i>
TRPV	<i>transient receptor potentiel vanilloïde</i>
UDP	uridine diphosphate
UGGT	(UDP)-glucose glycoprotéine glucosyltransférase
UPR	<i>unfolded protein response</i>
USP	<i>ubiquitin specific peptidase</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEMS	volume expiratoire maximal par seconde
VIP	<i>vasoactive intestinal peptide</i>

VM	vésicules matricielles
WNKs	<i>with no lysine kinases</i>
wt	<i>wild-type</i>
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>

Autres :

pM, nM, μM, mM	pico, nano, micro, milli molaire
ng/ml	nanogramme/millilitre
μg/l	microgramme/litre
mmol/l	millimole/litre
mV	millivolt
min/h	minute/heure

Liste des figures

- Les figures sont retrouvées au verso des pages mentionnées ci-dessous

- Figure 1 :** Représentation schématique des principaux transports ioniques au sein d'un épithélium sécréteur (**page 22**)
- Figure 2 :** Carte de la prévalence de la mucoviscidose par département (nombre de patients pour 100 000 habitants) (**page 23**)
- Figure 3 :** Les principaux organes touchés chez les malades atteints de mucoviscidose (**page 24**)
- Figure 4 :** Représentation schématique de l'impact de l'altération du processus de sécrétion sur la clairance mucociliaire dans les voies aériennes (**page 25**)
- Figure 5 :** Organigramme du dépistage néonatal de la mucoviscidose (**page 27**)
- Figure 6 :** Du gène à la protéine CFTR (**page 30**)
- Figure 7 :** Représentation schématique des différentes classes de mutations (**page 32**)
- Figure 8 :** Les transporteurs ABC : structure et mode de fonctionnement (**page 35**)
- Figure 9 :** Les différents domaines de la protéine CFTR (**page 36**)
- Figure 10 :** Modélisation 3D de l'organisation des segments transmembranaires du CFTR (**page 37**)
- Figure 11 :** Séquences des différents motifs des NBDs de la protéine CFTR (**page 38**)
- Figure 12 :** Modèles d'organisation spatiale « tête-bêche » des NBDs du CFTR (**page 39**)
- Figure 13 :** Le résidu F508 impliqué dans un contact essentiel entre NBD1 et TMD2 (**page 40**)
- Figure 14 :** Localisation des résidus sérine (S) et thréonine (T) phosphorylables par la PKA (**page 40**)
- Figure 15 :** Modèles proposés pour le cycle d'ouverture/fermeture du canal CFTR (**page 45**)
- Figure 16 :** La libération CFTR-dépendante de l'ATP impliquée dans la régulation de canaux ioniques (**page 49**)
- Figure 17 :** Quel modèle pour la pathologie pulmonaire dans la mucoviscidose ? (**page 53**)
- Figure 18 :** Biosynthèse et transport intracellulaire de la protéine CFTR (**page 57**)
- Figure 19 :** Modèle du processus d'assemblage de la protéine CFTR (**page 58**)
- Figure 20 :** Modifications de la chaîne oligosaccharidique au cours de la maturation de la protéine CFTR (**page 58**)
- Figure 21 :** Rôle des chaperons moléculaires dans l'aide au repliement et le ciblage des protéines CFTR mal conformées vers la dégradation (**page 60**)
- Figure 22 :** Représentation schématique du « cycle de la calnexine » (**page 61**)
- Figure 23 :** Le CFTR et ses multiples partenaires dans le compartiment apical (**page 63**)
- Figure 24 :** Modulation de l'activité du canal CFTR par le complexe de signalisation macromoléculaire CFTR/NHERF1/ β 2-AR (**page 66**)
- Figure 25 :** Modulation de l'activité du canal CFTR par le complexe de signalisation macromoléculaire CFTR/NHERF2/LPA₂ (**page 66**)
- Figure 26 :** De multiples partenaires impliqués dans le transport post-golgien du CFTR (**page 67**)

- Figure 27 :** Adressage apical du CFTR par la voie non conventionnelle dépendante des GRASPs (**page 68**)
- Figure 28 :** Représentation schématique du trafic apical de la protéine CFTR (**page 69**)
- Figure 29 :** Localisation du CFTR dans les lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines CFBE41o-/wt et CFBE41o-/F508del (**page 70**)
- Figure 30 :** Comparaison de la structure du NBD1 sauvage et F508del (**page 72**)
- Figure 31 :** Altération du processus d'assemblage de la protéine CFTR-F508del (**page 73**)
- Figure 32 :** Représentation des différentes voies de signalisation activées au cours de l'UPR (**page 74**)
- Figure 33 :** Le CFTR-F508del et le contrôle de qualité périphérique des protéines (**page 76**)
- Figure 34 :** Structures chimiques de correcteurs et potentiateurs identifiés lors de criblages à haut débit (**page 81**)
- Figure 35 :** Représentation tridimensionnelle de l'annexine A5 (**page 89**)
- Figure 36 :** Organisation structurale des annexines de vertébrés (**page 90**)
- Figure 37 :** Modèle décrivant les différentes conformations de l'annexine A1 et l'engagement de son domaine N-terminal dans le phénomène d'agrégation de membranes (**page 92**)
- Figure 38 :** Différentes organisations de l'annexine A5 (**page 96**)
- Figure 39 :** Modèle décrivant le rôle du tétramère AnxA1-S100A11 dans la formation des vésicules internes des endosomes multi-vésiculaires (**page 100**)
- Figure 40 :** Réponses des cellules wt-PV et AnxA5-null à une irradiation laser en présence de 2 mM de calcium (**page 103**)
- Figure 41 :** Modèle de réparation des membranes cellulaires proposé par Bouter *et al.* (**page 104**)
- Figure 42 :** Modèle proposé pour la nouvelle voie d'endocytose dépendante de l'annexine A5 et des phosphatidylsérines (**page 105**)
- Figure 43 :** Représentation simplifiée de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique de mammifères (**page 116**)
- Figure 44 :** Représentation schématique de la structure de la GnRH mammalienne (**page 117**)
- Figure 45 :** Représentation schématique de la structure du gène et de l'ARNm de la GnRH de mammifères (**page 117**)
- Figure 46:** Représentation schématique du récepteur de la GnRH humain (**page 118**)
- Figure 47 :** Modèle décrivant les différentes voies de signalisation associées au RGnRH dans les cellules gonadotropes (**page 119**)
- Figure 48 :** De la molécule naturelle aux analogues de la GnRH (**page 126**)
- Figure 49 :** Localisation du RGnRH dans les lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o- (**page 180**)
- Figure 50 :** Étude de l'expression membranaire du RGnRH dans les lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o- par biotinylation (**page 181**)

Liste des tableaux

- Attention, certains tableaux sont retrouvés au verso des pages mentionnées ci-dessous (*)

Tableau I :	Répartition des différents types de mutations identifiées sur le gène <i>CFTR</i> (page 31)*
Tableau II :	Mécanismes de régulation de l'ouverture du canal CFTR par la PKA (page 46)*
Tableau III :	Principales caractéristiques des protéines PDZ liant le CFTR (page 64)*
Tableau IV :	Nomenclature de la superfamille des annexines (page 88)*
Tableau V :	Synthèse des caractéristiques structurales et des principales propriétés de l'AnxA5 (page 98)
Tableau VI :	Synthèse des principales activités intracellulaires et extracellulaires décrites pour l'AnxA5 (page 107)
Tableau VII :	Récapitulatif des différentes études témoignant d'un lien entre les annexines et la protéine CFTR (page 112)
Tableau VIII :	Résumé des différents sites d'expression extra-hypophysaires décrits chez l'Homme pour le récepteur de la GnRH (tissus normaux) (page 124)
Tableau IX :	Résumé des différents sites d'expression extra-hypophysaires décrits chez l'Homme pour le récepteur de la GnRH (tissus tumoraux) (page 126)
Tableau X :	Séquence en acides aminés des principaux agonistes et antagonistes de la GnRH utilisés en thérapeutique humaine (page 126)*

Liste des modèles cellulaires

Lignées cellulaires : (origine)

A549	lignée cellulaire dérivée d'un carcinome pulmonaire humain (alvéolaire)
BHK-21	fibroblastes rénaux de hamster doré (<i>baby hamster kidney</i>)
Calu-1	lignée cellulaire dérivée d'un carcinome épidermoïde du poumon humain (malpighien)
Calu-3	lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome pulmonaire humain, exprimant de manière endogène le CFTR sauvage
CFBE410-	cellules épithéliales bronchiques humaines, exprimant de manière endogène le CFTR muté F508del (homozygotes F508del/F508del)
CF-KM4	cellules épithéliales séreuses humaines, exprimant de manière endogène le CFTR muté F508del (homozygotes F508del/F508del)
CFT-1/CFT-2	cellules épithéliales trachéobronchiques humaines CF (trachée d'origine fœtale), CFT-1 (S549N/N1303K), CFT-2 (F508del/F508del) (gène <i>CFTR</i>)
C127	lignée cellulaire dérivée d'une tumeur mammaire murine
ES-2	lignée cellulaire dérivée d'un carcinome de l'ovaire humain
56FHTe8o-	cellules épithéliales trachéobronchiques humaines non-CF (trachée d'origine fœtale)
GT1-7	neurones hypothalamiques immortalisés murins
16HBE14o-	cellules épithéliales bronchiques humaines, exprimant de manière endogène le CFTR sauvage
HEK-293	cellules épithéliales rénales humaines (<i>human embryonic kidney</i>)
HeLa	lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome utérin humain
HHUA	lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome de l'endomètre humain
HT-29	lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome du côlon humain, exprimant de manière endogène le CFTR sauvage
H1299	lignée cellulaire dérivée d'un carcinome pulmonaire humain
IB3-1	cellules épithéliales bronchiques humaines, hétérozygotes F508del/W1282X (gène <i>CFTR</i>)
JME-CF15	cellules épithéliales nasales humaines, exprimant de manière endogène le CFTR muté F508del (homozygotes F508del/F508del)
Jurkat	lignée cellulaire dérivée d'un lymphome à cellules T aigü humain
L-Cells	fibroblastes de tissu conjonctif sous-cutané murin (aérolaire et adipeux)
LβT2	cellules gonadotropes murines
LLC-PK1	cellules épithéliales rénales porcines
MDCK	cellules épithéliales rénales canines (<i>Madin-Darby canine kidney</i>)
MM39	cellules épithéliales séro-muqueuses humaines, exprimant de manière endogène le CFTR sauvage
NCI-H441	lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome pulmonaire humain (bronchiolaire)

NT-1	cellules épithéliales trachéobronchiques humaines non-CF (trachée d'origine fœtale)
THP-1	lignée cellulaire dérivée d'une leucémie monocyttaire aigüe humaine
T84	lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome du côlon humain, exprimant de manière endogène le CFTR sauvage
1-5c-4	cellules épithéliales de conjonctive humaine (« Chang »)

Autres modèles : (primaires)

TCE	<i>tall columnar epithelial (cells)</i>
HBEC	cellules épithéliales bronchiques humaines
HNEC	cellules épithéliales nasale humaines
HUVECs	cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)

INTRODUCTION

Partie 1. Contexte physiopathologique : la mucoviscidose

1. Les transports épithéliaux : généralités

Les épithélia sont des tissus composés d'un ensemble de cellules juxtaposées, séparées du tissu conjonctif par la membrane basale. Ils établissent une barrière cellulaire cohésive entre deux milieux de nature différente, laquelle assure des fonctions essentielles.

L'épithélium de l'arbre trachéo-bronchique est engagé dans le transport transépithélial des électrolytes et de l'eau, de façon à maintenir une hydratation correcte du liquide de surface des voies aériennes (ASL, *airway surface liquid*). Ce dernier est composé de deux phases : une phase aqueuse (**le liquide périciliaire**), dans laquelle battent les cils vibratiles permettant l'évacuation hors des voies aériennes des particules inhalées (pathogènes, poussières, pollens), et une phase muqueuse (**le mucus**). La clairance mucociliaire représente un des principaux mécanismes de défense des voies respiratoires. Toute modification du volume de la phase aqueuse se verra fortement compromettre son efficacité (pour revues : Knowles et Boucher, 2002, Tarran, 2004).

Deux variétés d'épithélia sont décrites : l'épithélium de revêtement, bordant par exemple la lumière du tube digestif (épithélium prismatique simple) ou des voies aériennes (épithélium prismatique pseudo-stratifié) et l'épithélium glandulaire, pouvant être associé à l'épithélium de revêtement, qui tapit les glandes sous-muqueuses respiratoires et digestives.

La somme des transports ioniques (actifs et passifs), au sein d'un épithélium, va permettre de définir la direction des mouvements d'eau et d'électrolytes. En effet, ces transports créent des gradients électrochimiques de part et d'autre de la membrane cellulaire, déterminant ainsi le sens des flux transépithéliaux et le caractère absorbant ou sécrétoire des épithélia. Dans la plupart des conditions physiologiques normales, l'épithélium de surface des voies aériennes et digestives est principalement absorbant (Boucher, 1994a,b). L'épithélium retrouvé au niveau des cryptes intestinales et des glandes sous-muqueuses respiratoires est quant à lui un exemple d'épithélium sécréteur (pour revue : Kunzelmann, 2001).

À l'état basal, la présence des canaux ENaC [*epithelial sodium (Na^+) channel*] dans la membrane apicale des cellules de l'épithélium de surface permet l'entrée des ions Na^+ , qui sont par la suite évacués de la cellule au niveau du pôle basolatéral par la pompe Na^+/K^+ ATPase (ATP, adénosine triphosphate). L'activité de cette pompe va également conduire à une accumulation d'ions potassium (K^+) dans le cytoplasme, créant un gradient électrochimique favorable à leur efflux. Le transport transcellulaire d'ions Na^+ génère un passage d'ions chlorure (Cl^-). Celui-ci s'effectue selon leur gradient électrochimique et principalement par la voie paracellulaire, dite voie de « *shunt* ». Ce transport passif est essentiel pour garantir l'électroneutralité du système et induire une absorption d'eau, également par la voie paracellulaire (Tarran *et al.*, 2001). Dans certaines circonstances, un transport d'ions Cl^- par voie transcellulaire peut aussi être observé. Cette sécrétion s'effectue selon un gradient électrochimique entretenu par des transporteurs d'ions Cl^- situés dans la membrane basolatérale, tel le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC). Dans un contexte non pathologique,

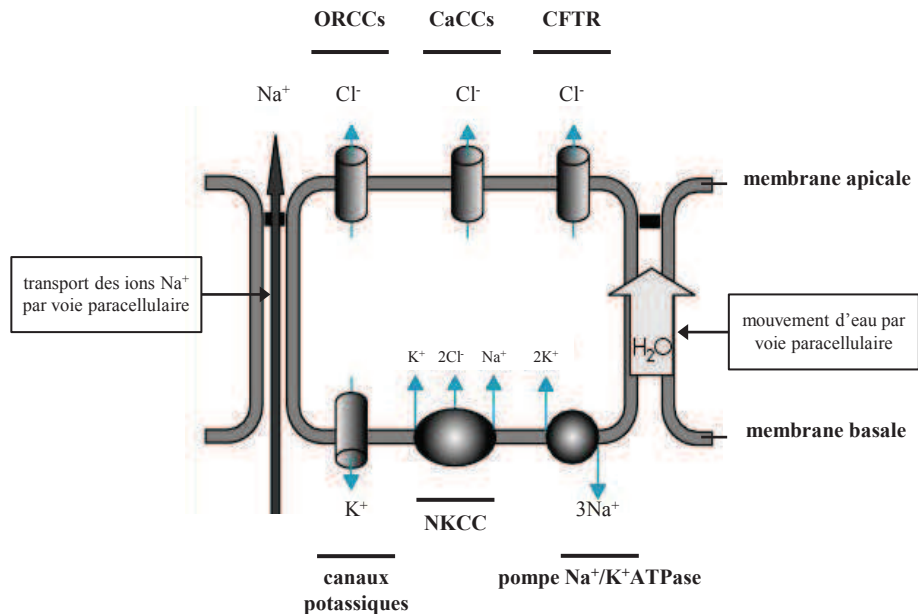


Figure 1 : Représentation schématique des principaux transports ioniques au sein d'un épithélium sécréteur

Selon le modèle classique, l'entrée des ions Cl^- à travers la membrane basolatérale est principalement médiée par le cotransport des ions Na^+ . L'efflux chlorure à la membrane apicale est quant à lui assuré par des canaux activés par l'AMPc (CFTR) et les ions Ca^{2+} (CaCCs). Des travaux récents ont permis l'identification d'autres transporteurs et canaux dans le mouvement des ions et de l'eau à travers les épithélia. À titre d'exemple, l'efflux apical des ions Cl^- et HCO_3^- implique le CFTR, la protéine TMEM16A (anoctamine-1) et très probablement d'autres transporteurs, tels que des membres de la famille des SLC26A (pour revue : Frizzell et Hanrahan, 2012).

AMPc : adénosine monophosphate cyclique, ATP : adénosine triphosphate, CaCCs : *calcium-activated chloride channels*, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, Cl^- : ion chlorure, HCO_3^- : ion bicarbonates, K^+ : ion potassium, Na^+ : ion sodium, NKCC : cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, ORCCs : *outwardly rectifying chloride channels*, SLC26 : *solute carrier 26*

adaptée de la revue de Edelman et Fritsch, 2005

les ions Cl^- sont sécrétés par différents canaux ioniques situés dans la membrane apicale, et notamment par les canaux CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), ORCC (*outwardly rectifying chloride channel*), CaCC [calcium (Ca^{2+})-activated chloride channel] et certains canaux Cl^- voltage dépendant tel CIC-2.

Dans les épithélia sécréteurs, la sortie des ions Cl^- suit le même modèle que celui décrit pour l'épithélium de surface (**Figure 1**). Le cotransporteur NKCC permet l'entrée des ions Cl^- dans la cellule qui, en s'accumulant dans le cytosol, créent un gradient électrochimique favorable à leur sécrétion au niveau du pôle apical par les canaux CFTR, ORCC et CaCC. Ce transport, à l'origine d'une différence de potentiel transépithélial, s'accompagne d'un passage d'ions Na^+ et d'eau par la voie paracellulaire.

Dans les voies respiratoires, c'est la sécrétion anionique qui contribue principalement à la formation et à l'entretien de l'ASL, sécrétion assurée en partie par le canal CFTR. Les cellules ciliées de l'épithélium de surface présentent ce processus de sécrétion. Cependant, il semble admis qu'un volume significatif du liquide périliciliaire (PCL, *periciliary liquid*) soit également généré par les transports transépithéliaux assurés par les glandes sous-muqueuses présentes dans les voies aériennes les plus proximales. L'épithélium de surface serait quant à lui capable d'ajuster le volume du PCL à une hauteur en adéquation avec un battement optimal des cils vibratiles. Cette régulation du volume du PCL met en jeu divers mécanismes tels que l'absorption des ions Na^+ par les canaux ENaC. De l'équilibre entre la sécrétion et l'absorption des électrolytes, dépendra le volume de la couche de liquide recouvrant la surface des voies aériennes et donc, l'efficacité des mécanismes de défense de ces dernières (pour revues : Kunzelmann et Schreiber, 2012, Frizzell et Hanrahan, 2012).

2. Historique et épidémiologie de la mucoviscidose

2.1. Histoire de la maladie

« Malheur à l'enfant chez qui un baiser sur le front à un goût salé, il est maudit et va bientôt mourir ». Ce vieil adage issu du folklore de l'Europe du Nord prédisait déjà un des principaux tests de référence utilisés dans le diagnostic de la mucoviscidose : le test de la sueur.

Au **Moyen Âge**, on connaissait déjà le sort du nouveau-né qui laisse un gout salé lorsqu'on l'embrasse sur le front. Néanmoins, ce n'est que dans la première moitié du XX^{ème} siècle, en **1936**, que la première description scientifique de la maladie est établie par le professeur Guido Fanconi, associant fibrose kystique du pancréas et bronchectasies (Fanconi *et al.*, 1936). En **1938**, grâce aux travaux de Dorothy Hansine Andersen, la maladie est reconnue comme une entité pathologique à part entière. Le terme « *cystic fibrosis of the pancreas* » est alors employé (Andersen, 1938).

La dénomination « *mucoviscidosis* », créée à partir des mots « *mucus* » et « *viscous* », n'apparaît qu'en **1943**. Elle est initiée par l'américain Sydney Farber afin de corriger le terme utilisé par Dorothy Hansine Andersen, trop centré sur l'atteinte pancréatique (Farber, 1943). Les premières études sur l'hérédité de la mucoviscidose sont conduites en **1946**, révélant sa transmission selon un mode autosomique récessif (Andersen et Hodges, 1946).

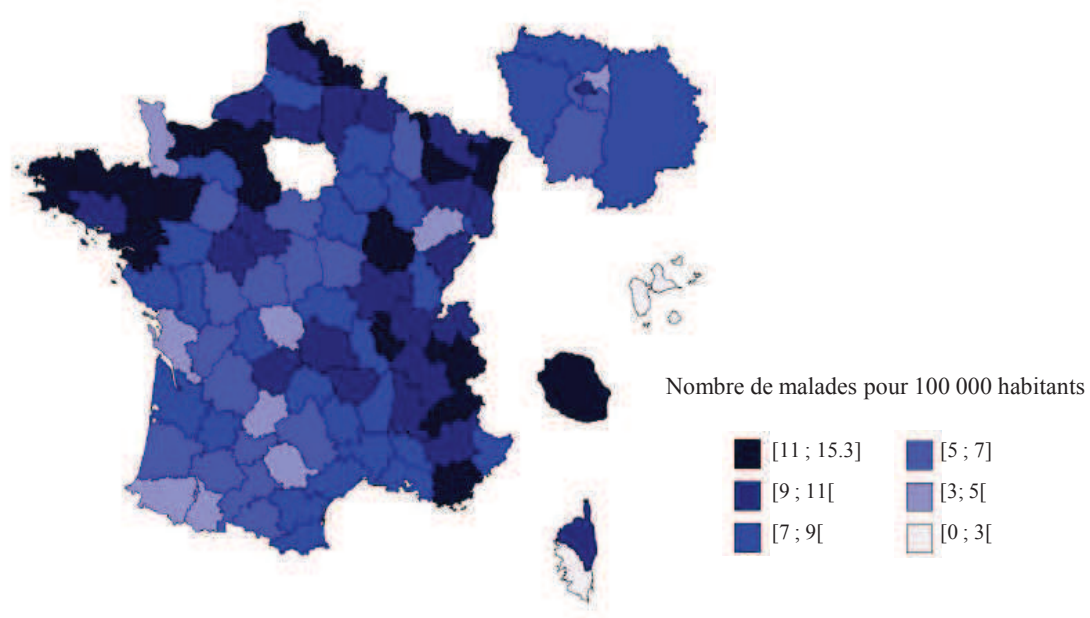


Figure 2 : Carte de la prévalence de la mucoviscidose par département
(nombre de patients pour 100 000 habitants)

La prévalence de la mucoviscidose, qui est en moyenne de 8.1 malades pour 100 000 habitants sur l'ensemble du territoire (métropole et îles de la Réunion et de la Guadeloupe), présente d'importantes variations selon les départements. En métropole, la majorité des malades se concentre, en premier lieu, sur un arc nord-ouest (régions Nord-Pas-de-Calais, Haute et Basse-Normandie, Bretagne, Pays de la Loire), et, en second lieu, sur un arc est (régions Lorraine, Franche-Comté, Rhône-Alpes, Provence-Alpes-Côte d'Azur).

d'après le Registre français de la mucoviscidose (RFM), Bilan des données 2011

L'année **1953** est marquée par une avancée majeure dans la compréhension de la maladie. Le docteur Paul Di San't Agnese décrit les anomalies électrolytiques dans les sécrétions sudorales des enfants malades : concentrations en ions Cl^- et Na^+ anormalement élevées (Di San't Agnese *et al.*, 1953). Cette découverte est d'ailleurs à l'origine de la mise en place du test de la sueur, initié en **1959** par Gibson et Cooke.

En **1981**, Knowles et collaborateurs rapportent que le potentiel électrique au niveau de la muqueuse nasale est plus électronégatif chez les personnes atteintes de mucoviscidose que chez les sujets sains (Knowles *et al.*, 1981). En **1983**, Paul Quinton précise l'origine de ces anomalies électrolytiques : la perméabilité anormalement faible des cellules épithéliales des canaux sudoripares aux ions Cl^- conduit à une augmentation de la concentration en NaCl dans la sueur des patients (Quinton, 1983). Très rapidement, Knowles et associés décrivent ce même défaut de perméabilité aux ions Cl^- dans l'épithélium respiratoire des malades, lequel est associé à une absorption excessive des ions Na^+ (Knowles *et al.*, 1983a,b).

L'année **1989** est un tournant important dans l'histoire de la mucoviscidose. Lap-Chee Tsui en collaboration avec Jack Riordan et Francis Collins isolent le gène impliqué dans la maladie et caractérisent son anomalie moléculaire principale : la mutation F508del (c.1521_1523delCTT). Ces travaux sur le gène *CFTR* furent publiés en trois articles en septembre 1989 dans le journal Science. Localisé sur le bras long du chromosome 7 et composé de 27 exons, ce gène code un canal ionique perméable aux ions Cl^- : le canal CFTR (Kerem *et al.*, 1989, Riordan *et al.*, 1989, Rommens *et al.*, 1989, Anderson *et al.*, 1991b).

En **2002**, le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose est mis en place en France (Farriaux, 2002). En janvier **2012**, la molécule VX-770 reçoit l'approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*) pour les patients porteurs de la mutation G551D (c.1652G>A) (Ramsey *et al.*, 2011).

2.2. Quelques données épidémiologiques

La mucoviscidose, ou *cystic fibrosis* (CF), est la plus fréquente des maladies autosomiques récessives graves dans les populations caucasiennes, touchant en moyenne un nouveau-né sur 3000. En France, où sont actuellement recensés près de 6500 patients, l'incidence est d'environ un cas toutes les 4200 naissances, soit environ 200 par an, avec de grandes disparités régionales (source : <http://www.vaincrelamuco.org>) (**Figure 2**). La mucoviscidose est particulièrement présente en Bretagne, touchant en moyenne un nouveau-né sur 2900, contre une incidence de un cas toutes les 7000 naissances en Midi-Pyrénées (Munck et Roussey, 2008, Scotet *et al.*, 2010).

La population française compte près de deux millions de porteurs sains (hétérozygotes), soit en moyenne entre 1 individu sur 30 et 1 individu sur 35 présentant un allèle anormal du gène *CFTR* (Munck et Roussey, 2008, pour revue : Férec *et al.*, 2012).

3. Les différentes manifestations de la maladie

La protéine CFTR est principalement retrouvée au niveau des épithélia sécréteurs, mais certains de type absorbant l'expriment également. Inséré dans la membrane apicale (ou luminale) des cellules

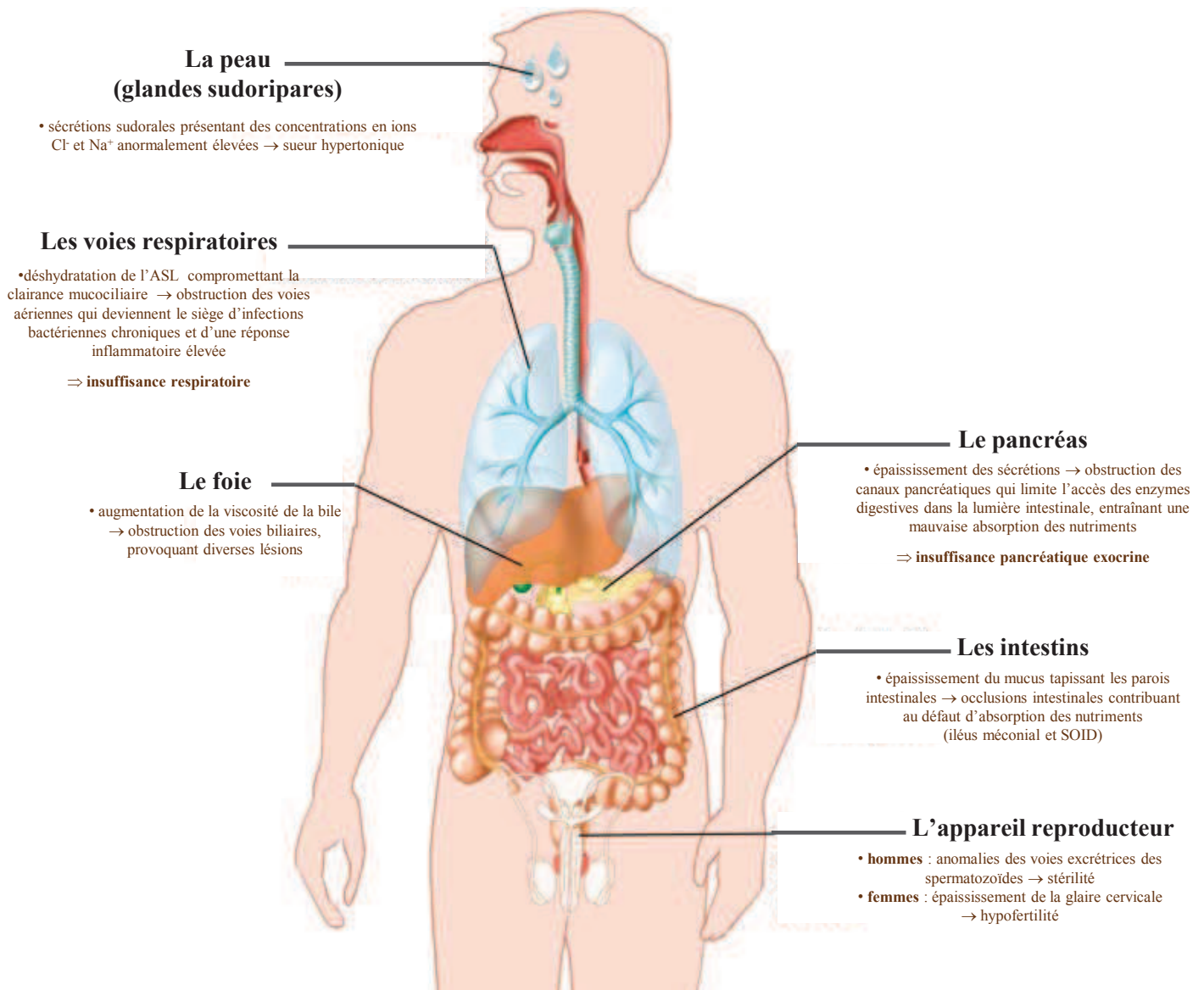


Figure 3 : Les principaux organes touchés chez les malades atteints de mucoviscidose

ASL : liquide de surface des voies aériennes (*airway surface liquid*), Cl^- : ion chlorure, Na^+ : ion sodium, SOID : syndrome d'obstruction intestinale distale

adaptée de http://fr.medipedia.be/Files/media/photos/Mucoviscidose/Gallery/organes-mucoviscidose_en-images.jpg

épithéliales, le CFTR joue un rôle fondamental dans le transport transépithélial des électrolytes et de l'eau (Quinton, 1983, Anderson *et al.*, 1991b, Bear *et al.*, 1992). Cette veille au maintien de l'homéostasie des fluides recouvrant la surface des épithélia s'explique par ses fonctions de canal ionique (entre autres : sécrétion d'ions Cl⁻) et de protéine régulatrice de divers canaux et transporteurs.

La présence d'anomalies moléculaires dans le gène *CFTR* entraînera de graves conséquences, avec des répercussions principalement observées au niveau des voies respiratoires, du tube digestif et de ses annexes, du tractus génital et des glandes sudoripares (**Figure 3**). La mucoviscidose, maladie complexe et évolutive, va donc affecter de nombreux organes.

Il existe une grande diversité d'expression clinique d'un patient à l'autre, que ce soit en termes d'âge d'apparition des premiers symptômes, d'organes touchés, de sévérité des atteintes et d'évolution de la maladie. Ceci peut s'expliquer par les multiples mutations du gène *CFTR* qui ont été identifiées. Toutefois, il apparaît que des facteurs génétiques et environnementaux contribuent également à cette grande variabilité phénotypique (pour revues : Cutting, 2005, Férec *et al.*, 2012). Des patients porteurs des mêmes mutations pourront développer des tableaux cliniques très différents, notamment en ce qui concerne l'atteinte respiratoire.

3.1. Atteintes des voies respiratoires

L'atteinte broncho-pulmonaire conditionne l'essentiel de la mortalité et de la morbidité (pour revues : Davis, 2006, Davies *et al.*, 2007). Chez les patients, le déclin de la fonction pulmonaire se traduit par une diminution du VEMS (volume expiratoire maximal par seconde). Bien que des progrès considérables aient été faits dans la compréhension de la physiopathologie de la mucoviscidose, les mécanismes responsables du développement de la maladie pulmonaire ne sont pas entièrement résolus et restent controversés.

De quelle façon le défaut de transport ionique dépendant du CFTR affecte-t-il le système de défense pulmonaire lui permettant de faire face aux bactéries inhalées ? Deux hypothèses ont été émises. Certains auteurs avancent que la modification de la composition de l'ASL impacte l'activité des peptides antimicrobiens (Smith *et al.*, 1996). Pour d'autres, le défaut de transport ionique transépithélial affecte l'élimination des bactéries en altérant la clairance mucociliaire (Matsui *et al.*, 1998).

Chez les patients, le défaut d'expression et/ou de fonctionnalité du canal CFTR va mener à la déshydratation de l'ASL, compromettant l'évacuation du mucus hors des voies respiratoires. Cette altération de la clairance mucociliaire conduit à l'accumulation de ce mucus anormalement visqueux au niveau de l'arbre bronchique, entraînant son obstruction. Ce mucus stagnant devient un terrain propice à la colonisation et à l'infection des voies respiratoires par des germes spécifiques (**Figure 4**).

Parmi les bactéries les plus communément rencontrées chez les malades, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, SA) et *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*, HI) sont des colonisateurs précoces des voies aériennes. Le pathogène *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, PA) est, quant à lui, un

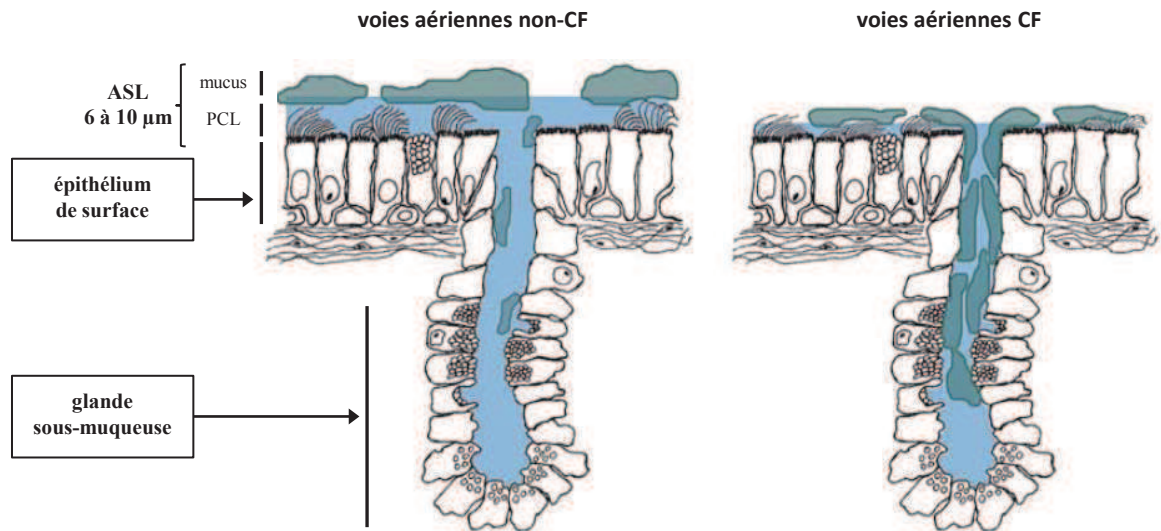


Figure 4 : Représentation schématique de l'impact de l'altération du processus de sécrétion sur la clairance mucociliaire dans les voies aériennes

Les transports d'électrolytes médiés par l'épithélium de surface et les glandes sous-muqueuses contribuent tout deux au volume et à la composition de l'ASL. Chez les personnes atteintes de mucoviscidose, un défaut d'expression et/ou de fonctionnalité du canal CFTR à la membrane apicale des cellules épithéliales va compromettre i) la sécrétion de sels et d'eau, ii) la régulation du PCL et iii) la clairance du mucus au niveau de l'épithélium de surface et des canaux des glandes sous-muqueuses. Cette accumulation de mucus conduit à l'obstruction des voies aériennes et favorise leur colonisation par des germes spécifiques et le processus inflammatoire.

Remarque : le terme « voies aériennes non-CF » signifie « qui expriment une version normale du canal CFTR », à la différence du terme « voies aériennes CF », signifiant « qui expriment une version mutante du canal CFTR ».

ASL : liquide de surface des voies aériennes (*airway surface liquid*), CF : *cystic fibrosis*, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, Cl⁻ : ion chlorure, PCL : liquide péréciliaire (*periciliary liquid*), µm : micromètre

adaptée de la revue de Frizzell et Hanrahan, 2012

colonisateur plus tardif. L'infection chronique par ce germe marque généralement un tournant évolutif défavorable de la maladie. Une colonisation par des champignons, tout particulièrement *Aspergillus*, peut également être observée. En 2011, ce germe a été identifié chez près de 23 % des patients français [source : Registre français de la mucoviscidose (RFM), Bilan des données 2011].

L'atteinte pulmonaire s'accompagne d'une réponse inflammatoire élevée, conduisant à la détérioration du tissu pulmonaire (pour revue : Delacourt, 2003). À ce jour, malgré les nombreuses études menées à ce sujet, le débat n'est toujours pas tranché de savoir si l'inflammation des voies aériennes précède ou non la première infection. Le cercle vicieux (surinfections chroniques et inflammation) qui s'installe dans les voies aériennes des malades, conduit à une destruction progressive et irréversible du parenchyme et à une fibrose pulmonaire. Cela aboutira *in fine* à l'insuffisance respiratoire, cause principale de décès.

3.2. Atteintes digestives (hépatobiliaires, pancréatiques et gastro-intestinales)

Une atteinte hépatobiliaire est également observée chez certains patients, avec un degré de sévérité variable entre les malades. Des anomalies de la protéine CFTR au niveau des voies biliaires conduisent à l'augmentation de la viscosité de la bile et de la concentration de ses composants. La bile épaissie, qui n'est plus évacuée, s'accumule dans les canaux hépatiques et les obstrue, provoquant diverses lésions (pour revue : Sokol et Durie, 1999). La vésicule biliaire peut également être touchée. Environ 30 % des malades présentent une vésicule atrophiée et peu fonctionnelle (pour revue : Herrmann *et al.*, 2010). Des cas de lithiase biliaire sont quelquefois constatés.

Près de 90 % des patients présentent à la naissance une insuffisance pancréatique (IP) exocrine (pour revue : Davies *et al.*, 2007). L'épaississement des sécrétions obstrue les canaux pancréatiques et limite l'écoulement des enzymes digestives dans la lumière intestinale. Cela conduit à une mauvaise absorption des graisses, protéines, vitamines et minéraux, impactant l'état nutritionnel des patients. Associée à un retard de croissance staturo-pondérale, la dénutrition pourra être à l'origine d'un retard pubertaire et de l'apparition de pathologies osseuses. De plus, la stagnation des enzymes digestives dans les canaux pancréatiques va conduire à une destruction tissulaire progressive, provoquant une fibrose du pancréas. Cette caractéristique est d'ailleurs à l'origine de la dénomination initiale de la maladie : « fibrose kystique du pancréas ». Si cette dernière s'étend aux îlots de Langerhans, cela pourra découler sur un diabète insulino-dépendant.

À la différence de la maladie pulmonaire, il existe une bonne corrélation entre le génotype des patients et le statut de la fonction pancréatique exocrine.

Le premier signe de l'atteinte gastro-intestinale est l'iléus méconial. Retrouvé chez 10 à 15 % des nouveau-nés atteints, il constitue la manifestation clinique initiale de la maladie (Munck et Roussey, 2008, Scotet *et al.*, 2010). Cette occlusion peut être suspectée à l'échographie morphologique, par une hyperéchogénicité intestinale (pour revue : Eggermont et De Boeck, 1991). L'atteinte intestinale contribue, aux côtés de l'atteinte pancréatique, au défaut d'absorption des nutriments.

3.3. Atteintes du tractus génital

Plus de 95 % des hommes atteints de mucoviscidose présentent une anomalie des voies excrétrices des spermatozoïdes, entraînant leur stérilité (Denning *et al.* 1968, Holsclaw *et al.*, 1971, Anguiano *et al.* 1992). Les raisons de ce défaut anatomique (atrophie ou absence congénitale bilatérale des canaux déférents) ne sont pas entièrement clarifiées. Plusieurs hypothèses ont été proposées : une dégénérescence qui résulterait d'obstructions similaires à celles observées dans les canaux pancréatiques ou une anomalie de développement (Gaillard *et al.*, 1997).

Bien que l'appareil génital soit anatomiquement normal chez la femme, une hypofertilité est souvent observée. Celle-ci s'explique par un épaissement de la glaire cervicale qui entrave la migration des spermatozoïdes dans l'utérus (Oppenheimer *et al.*, 1970, Kopito *et al.*, 1973).

Il est également intéressant de signaler qu'un retard de puberté a souvent été décrit chez ces malades. La dénutrition est une des raisons principalement évoquées pour expliquer ce retard (Shwachman *et al.*, 1965, Mitchell-Heggs *et al.*, 1976, Stern *et al.*, 1976). Cependant, une étude menée chez des patientes adolescentes, homozygotes pour la mutation F508del, mentionne un retard de puberté en dépit d'un bon état clinique et d'un statut nutritionnel normal (Johannesson *et al.*, 1997).

La mise en évidence de transcrits du gène *CFTR* (transcrits *CFTR*) dans le cerveau de rat, puis dans l'hypothalamus humain, a permis d'envisager de nouvelles explications aux manifestations génitales de la mucoviscidose (Mulberg *et al.*, 1995, Mulberg *et al.*, 1998). Le groupe de A. E. Mulberg rapporte l'expression et la fonctionnalité du *CFTR* dans la lignée immortalisée de neurones à GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) murins (GT1-7) et montre que la protéine *CFTR* y régule la sécrétion de GnRH. Une baisse de l'expression de la protéine *CFTR* est en effet associée à une diminution de la libération de GnRH dans le milieu de culture (Weyler *et al.*, 1999). Il fut suggéré que la présence de mutants du *CFTR* dans certains neurones de l'hypothalamus pouvait perturber la synthèse des gonadotropines et la mise en place de la différenciation sexuelle. Un défaut de sécrétion de GnRH pourrait alors permettre d'expliquer la maturation plus tardive de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) chez les enfants CF (Weyler *et al.*, 1999).

3.4. Autres atteintes possibles

A côté des atteintes respiratoires, digestives et génitales, d'autres éléments de morbidité, plus rares et moins spécifiques, peuvent également être observés chez certains patients. Parmi ceux-ci peuvent être cités (au niveau national) : i) l'incontinence urinaire, observée chez 0.7 % des patients, ii) des atteintes articulaires (arthrite), retrouvées chez 1.9 % des malades, iii) une dépression, chez 3.2 % des individus, ou encore iv) des pathologies osseuses telles que l'ostéopénie et l'ostéoporose, décrites chez 5.7 % des patients CF (source : RFM, Bilan des données 2011).

L'atteinte des glandes sudoripares n'est volontairement pas traitée dans ce paragraphe. Elle sera développée par la suite, lors de l'explication du test de la sueur.

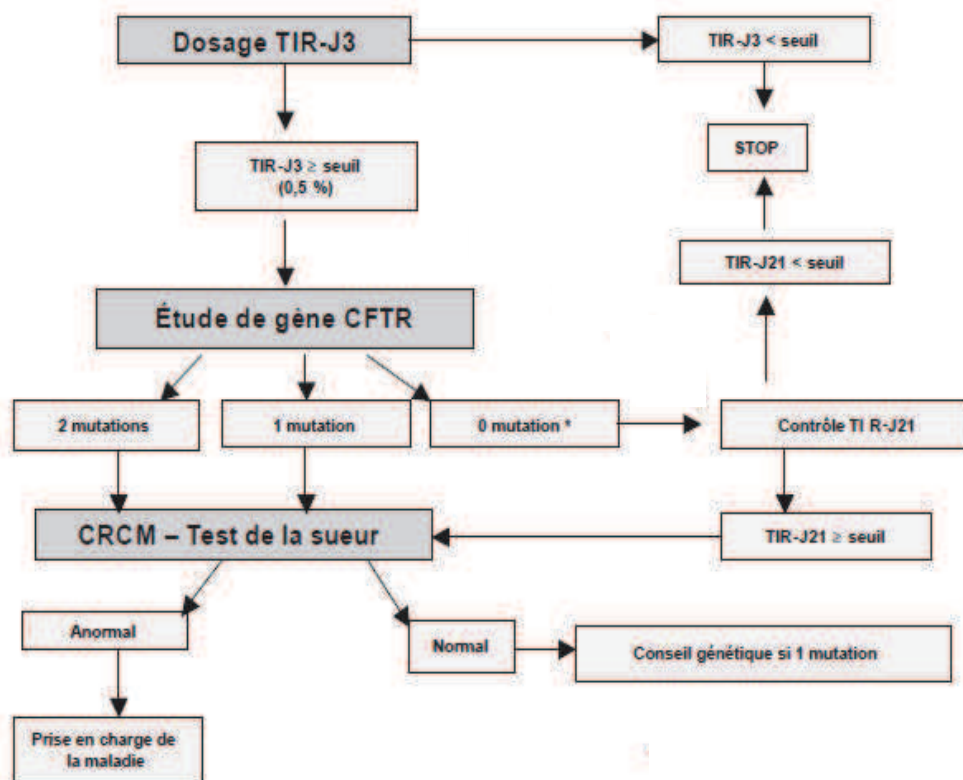


Figure 5 : Organigramme du dépistage néonatal de la mucoviscidose

Suite à l'obtention d'une valeur de TIR supérieure à la valeur seuil, la confirmation du diagnostic se poursuit par l'analyse moléculaire du gène *CFTR* uniquement après le consentement parental. Pour les nouveau-nés chez lesquels aucune mutation n'a été identifiée suite à l'étude de l'ADN, la réévaluation de la TIR à J21 n'est effectuée que pour les individus dont la TIR à J3 était supérieure à 100 µg/L. Ceci s'explique par le risque très faible de diagnostic de la mucoviscidose chez ces enfants (risque < 1 %).

ADN : acide désoxyribonucléique, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CRCM : Centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose, J3 ou J21 : 3 ou 21 jours après la naissance, TIR : trypsine immuno-réactive, µg/l : microgramme/litre

adaptée de Munck et Roussey, 2008

4. Dépistage et diagnostic de la mucoviscidose

L'instauration du dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France date de 2002 (Farriaux, 2002, Farriaux *et al.*, 2003, Navarro *et al.*, 2003). Celui-ci permet une prise en charge précoce dans les Centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM).

En dehors du dépistage néonatal, le diagnostic de la mucoviscidose peut être évoqué devant des signes cliniques tels que des diarrhées graisseuses, des douleurs abdominales, un encombrement des bronches, ou encore des infections des voies respiratoires à répétitions. Par la suite, le test de la sueur complété par l'analyse moléculaire du gène *CFTR* permettent de confirmer ou d'infirmer le diagnostic (source : RFM, Bilan des données 2011). Enfin, suivant l'histoire familiale, un diagnostic prénatal peut également être proposé.

4.1. Dépistage néonatal

Il repose sur le dosage de la trypsine immuno-réactive (TIR) sérique, qui est réalisé à partir d'un prélèvement d'une goutte de sang dans le talon du nouveau-né à son 3^{ème} jour de vie. Ce dépistage permet de repérer entre 95 et 98 % des nouveau-nés atteints de mucoviscidose. Les faux négatifs sont exceptionnels et les faux positifs ne dépassent pas 0.5 %. Suite à la détection d'un taux de TIR anormalement élevé ($> 60 \mu\text{g/l}$), la confirmation du diagnostic se poursuit par l'analyse moléculaire du gène *CFTR* et la recherche des mutations les plus fréquemment rencontrées dans les populations d'origine caucasienne (**Figure 5**). Une fois l'analyse génétique réalisée, trois cas de figure peuvent se présenter (Munck et Roussey, 2008, RFM, Bilan des données 2011) :

- 1- deux mutations sont identifiées chez le nouveau-né : ce dernier est adressé à un CRCM pour la confirmation du diagnostic par le test de la sueur et la prise en charge de la maladie ;
- 2- une seule mutation est identifiée chez le nouveau-né : soit il est porteur d'une autre mutation et le test de la sueur est positif (anormal), portant alors le diagnostic de la mucoviscidose ; soit il est hétérozygote, c'est-à-dire porteur sain, et présente un test de la sueur négatif (normal) ;
- 3- aucune mutation n'est détectée chez le nouveau-né : le risque que l'enfant soit atteint est très faible ($< 1 \%$).

4.2. Principaux tests utilisés dans le diagnostic de la mucoviscidose

4.2.1. Le test de la sueur

Physiologiquement, l'épithélium des glandes sudoripares est de type absorbant. Les ions Cl^- et Na^+ présents dans les sécrétions sudorales sont réabsorbés par les cellules épithéliales bordant le canal excréteur vers le compartiment sanguin. Chez les individus atteints de mucoviscidose, la perte de l'activité du canal *CFTR* ne permet pas cette réabsorption. Leur sueur présente donc des concentrations en ions Cl^- et Na^+ anormalement élevées, elle est dite hypertonique.

Le test de la sueur consiste à mesurer la concentration en ions Cl^- dans les sécrétions sudorales des patients. Une concentration en ions Cl^- inférieure à 40 mmol/l est considérée comme normale.

Celle-ci devient pathologique lorsqu'elle excède 60 mmol/l. Ce test, reposant sur la méthode de l'iontophorèse à la pilocarpine, reste à ce jour le test de référence pour le diagnostic de la mucoviscidose (Gibson et Cooke, 1959, LeGrys, 1996). Il est positif chez environ 98 % des malades (LeGrys, 1996).

4.2.2. Mesure de la différence de potentiel transépithéliale nasale

Le transport des ions à travers l'épithélium nasal génère une différence de potentiel (ddp) qu'il est possible de mesurer *in vivo*. La baisse de la sécrétion chlorure (sécrétion Cl^-) et l'absorption accrue d'ions Na^+ à la surface de la muqueuse nasale des malades se traduit par une valeur basale de la ddp transépithéliale plus électronégative. Alors qu'elle se situe autour de -20 millivolt (mV) chez les sujets sains, des valeurs aux alentours de -50 mV sont enregistrées chez les patients (Domingo-Ribas et Bosque-Garcia, 2006). La mesure de la ddp s'avère particulièrement utile pour l'identification de patients atteints de formes atypiques de la maladie, lesquels présentent un résultat du test sudoral douteux (valeur comprise entre 40 et 60 mmol/l) ou normal (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010b, pour revue : De Boeck *et al.*, 2006).

4.3. Le diagnostic prénatal

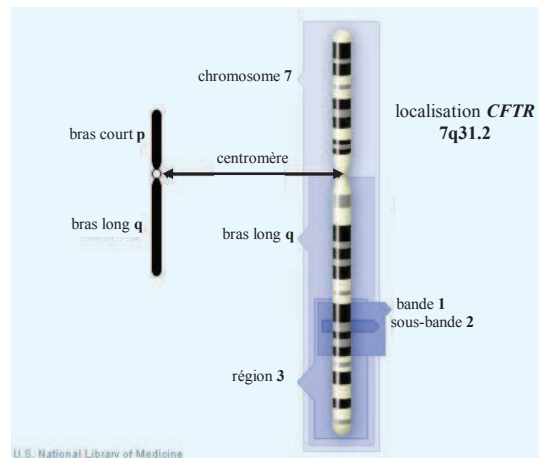
Le diagnostic prénatal de la mucoviscidose est proposé aux couples dont les deux membres sont hétérozygotes, ayant déjà eu un enfant atteint de mucoviscidose (Mennie *et al.*, 1992) ou identifiés par les études familiales (Super *et al.*, 1994). La mise en place d'un diagnostic prénatal peut également être initiée par la découverte, de façon fortuite, d'une hyperéchogénicité intestinale, laquelle peut être associée à d'autres signes, comme une dilatation des anses intestinales et une absence de visualisation de la vésicule biliaire (Dequeker *et al.*, 2009, pour revue : Eggermont et De Boeck, 1991).

5. La prise en charge actuelle de la maladie

Une des avancées majeures dans la thérapie de la mucoviscidose est l'identification du potentioteur VX-770, qui conduit à une amélioration significative de la fonction pulmonaire des patients porteurs de la mutation G551D (Ramsey *et al.*, 2011). Cette molécule, récemment approuvée par la FDA, ne s'adresse toutefois qu'à une très faible proportion de malades, la fréquence de la mutation G551D dépassant à peine le seuil de 1 %. Pour la grande majorité des patients, il n'existe pas de thérapie curative mais uniquement des traitements à visée symptomatique, permettant d'améliorer, ou tout au moins de ralentir, le profil évolutif de la maladie et l'apparition des lésions irréversibles. Ces traitements reposent essentiellement sur la prise en charge respiratoire (lutte contre l'obstruction des voies aériennes, l'infection bactérienne et l'inflammation) et la prise en charge digestive et nutritionnelle (apport d'enzymes pancréatiques, de vitamines liposolubles, régime alimentaire hypercalorique).

Ces traitements palliatifs ont permis d'améliorer considérablement l'espérance de vie des malades. Alors qu'elle n'était que de 7 ans en 1965, l'espérance de vie à la naissance d'un individu né aujourd'hui est de 46 ans (source : <http://www.vaincrelamuco.org>).

A.



B.

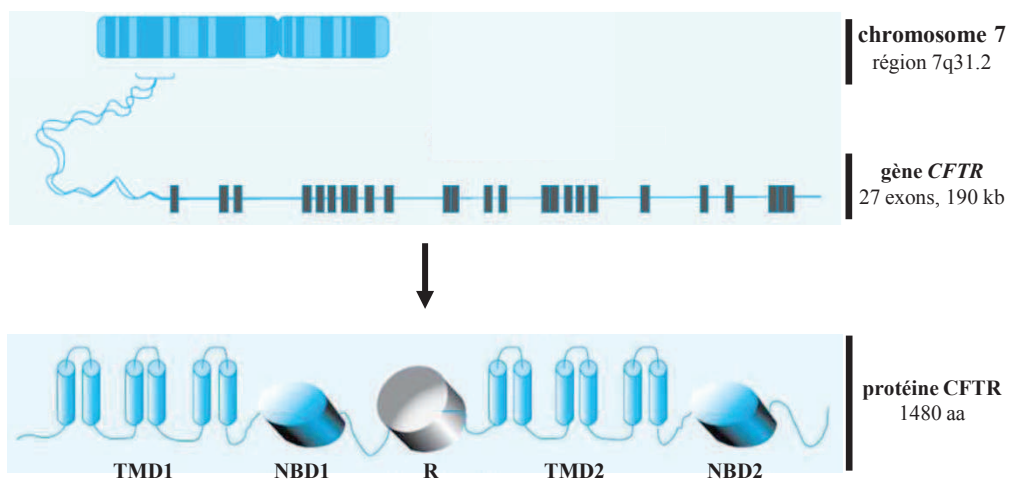


Figure 6 : Du gène à la protéine CFTR

A. Localisation chromosomique du gène *CFTR*. **B.** De la transcription du gène *CFTR* à la traduction en une protéine transmembranaire.

aa : acides aminés, ATP : adénosine triphosphate, *CFTR* : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, kb : kilobase, NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), R : domaine régulateur (*regulatory domain*), TMD1 et TMD2 : domaines transmembranaires (TMDs, *transmembrane domains*)

A. adaptée de <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/chromosomallocation.jpg>, *B.* adaptée de la revue de Romey, 2006

Partie 2. Le canal CFTR : du gène à la protéine

1. Le gène *CFTR* et son expression

1.1. Identification du gène *CFTR*

Le gène impliqué dans la mucoviscidose fut localisé en 1985 sur le bras long du chromosome 7 (Tsui *et al.*, 1985, Knowlton *et al.*, 1985), près de 40 ans après la description de l'origine génétique de la maladie (Anderson et Hodges, 1946). En 1989, la mise en place de la stratégie de clonage positionnel a permis une identification plus précise du locus et la caractérisation du gène *CFTR* (Figure 6). Ce dernier, localisé en position 7q31.2, est un grand gène s'étendant sur près de 190 kilobases (kb), structuré en 27 exons. Le gène *CFTR* est transcrit en un acide ribonucléique messager (ARNm) de 6.5 kb dont la séquence codante (4.4 kb) est par la suite traduite en une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés, le canal ionique CFTR (Kerem *et al.*, 1989, Riordan *et al.*, 1989, Rommens *et al.*, 1989).

1.2. Régulation spatio-temporelle du gène *CFTR*

L'expression du gène *CFTR* est sujette à une régulation spatiale et temporelle, avec des profils d'expression variant selon les tissus et au cours du développement. Bien que son promoteur représente un acteur clé dans le contrôle de son expression, il apparaît que ce dernier ne contienne pas les éléments nécessaires à une régulation aussi fine et complexe. Il est à noter que le promoteur du gène *CFTR*, qui présente des caractéristiques propres aux promoteurs des gènes de ménage (*housekeeping genes*), possède une activité transcriptionnelle relativement faible dans les cellules d'origine épithéliale (Yoshimura *et al.*, 1991b).

Principalement exprimé dans les divers organes (ou tissus) spécifiquement touchés par la mucoviscidose, la présence de transcrits *CFTR* a également été rapportée dans différents tissus (et cellules) non spécifiques à la maladie. Peuvent être cités : les cellules sanguines (Yoshimura *et al.*, 1991a, Sterling *et al.*, 2004), le tissu musculaire lisse (Robert *et al.*, 2004, Michoud *et al.*, 2009), l'épithélium des tubules rénaux (Crawford *et al.*, 1991), certaines cellules du tissu osseux (Shead *et al.*, 2007, Le Héron *et al.*, 2010), le myocarde (Yajima *et al.*, 1997) ou encore les neurones hypothalamiques (Mulberg *et al.*, 1998, Weyler *et al.*, 1999).

Si l'on considère son expression au cours du développement, des transcrits *CFTR* peuvent être détectés très tôt dans la vie embryonnaire, dès le stade huit cellules (Ben-Chetrit *et al.*, 2002). Des travaux réalisés sur des tissus sains issus de fœtus âgés de moins de 28 semaines rapportent des taux de transcrits *CFTR* élevés dans l'épithélium pulmonaire, trachéal, pancréatique et intestinal (cryptes de l'intestin grêle), mais relativement plus faible dans l'épithélium du tractus génital masculin (épididyme) (Harris *et al.*, 1991, McCray *et al.*, 1992, Trezise *et al.*, 1993). L'expression des transcrits *CFTR* dans le tractus génital féminin (utérus et trompes de Fallope), les glandes sudoripares et salivaires n'est détectée qu'à partir du 3^{ème} trimestre de grossesse (Tizzano *et al.*, 1994).

Tableau I : Répartition des différents types de mutations identifiées sur le gène *CFTR*

Type de mutation	Nombre recensé	Fréquence (%)
faux-sens	782	40,16
insertions ou délétions <u>avec</u> décalage du cadre de lecture	309	15,87
épissage	226	11,61
non-sens	161	8,27
insertions ou délétions <u>sans</u> décalage du cadre de lecture	38	1,95
grands réarrangements chromosomiques	49	2,52
promoteur	15	0,77
variations de séquence (polymorphismes)	269	13,82
non identifiées	98	5,03
TOTAL	1947 mutations et variations de séquence recensées	

CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

d'après la Cystic Fibrosis Mutation Database, <http://www.genet.sickkids.on.ca>, octobre 2013

Le profil d'expression mis en place au cours du développement fœtal est généralement maintenu après la naissance. Il existe néanmoins quelques exceptions, notamment concernant l'épithélium pulmonaire. Une grande différence d'expression est en effet retrouvée entre le taux de transcrits *CFTR* observé dans le poumon fœtal et le poumon adulte (Trezise *et al.*, 1993, Broackes-Carter *et al.*, 2002). L'expression du gène *CFTR* au niveau pulmonaire augmente progressivement à partir de la 12^{ème} semaine de grossesse pour atteindre un plateau au cours du 2^{ème} trimestre (entre la 20^{ème} et la 24^{ème} semaine), à partir duquel l'expression diminue progressivement jusqu'à la naissance. Une étude immunohistochimique a validé ces observations au niveau protéique (Marcorelles *et al.*, 2007).

2. Les anomalies moléculaires du gène *CFTR*

2.1. Les différents types de mutations

La mise en place d'un Consortium international d'analyse génétique de la mucoviscidose a permis de répertorier plus de 1940 mutations et variations de séquence, dispersées sur l'ensemble du gène. Il s'agit, pour la plupart, de mutations ponctuelles. Toutefois, de grands réarrangements chromosomiques (insertions, délétions, duplications) ont également été identifiés (Audrézet *et al.*, 2004, Férec *et al.*, 2006, Niel *et al.*, 2006, Taulan *et al.*, 2007). La répartition des anomalies génétiques est détaillée dans le **Tableau I**.

Parmi ces mutations, la F508del (c.1521_1523delCTT), qui entraîne la délétion d'une phénylalanine en position 508 de la protéine (p.Phe508del, selon la nomenclature HGVS, *Human Genome Variation Society*), est retrouvée sur plus de deux chromosomes mutés sur trois. La F508del constitue ainsi la mutation la plus fréquemment rencontrée chez les malades. En France, plus de 83 % des patients possèdent au moins un allèle porteur de cette mutation et près de 44 % sont homozygotes pour cette délétion (source : RFM, Bilan des données 2011). A côté de cela, la plupart des anomalies moléculaires du gène *CFTR* sont des événements rares, voire privés (rapportés dans une seule famille). Seules quelques mutations (environ une trentaine) présentent une fréquence supérieure à 0.1 %. Parmi celles-ci, la fréquence de cinq mutations avoisine le seuil de 1 %. Il s'agit des mutations exoniques G542X (p.Gly542X), N1303K (p.Asn1303Lys), G551D (p.Gly551Asp) et W1282X (p.Trp1282X) et de la mutation intronique 1717-1G>A (c.1585-1G>A) (Claustres *et al.*, 2000, pour revue : Férec *et al.*, 2012).

En fonction de l'origine géographique et ethnique des patients, le type de mutation ainsi que leur fréquence peuvent présenter une grande variabilité (pour revue : Férec *et al.*, 2012).

2.2. Les différentes classes de mutations

Le type de mutation ainsi que la localisation de ces variations nucléotidiques influencent différemment le produit final du gène. Des répercussions peuvent être observées au niveau de la biosynthèse, du transport intracellulaire, de la stabilité apicale et de la fonctionnalité de la protéine CFTR. Dans un premier temps, les différentes mutations ont été réparties en quatre classes distinctes (I à IV), sur la base des désordres engendrés sur la molécule CFTR (pour revue : Welsh et Smith,

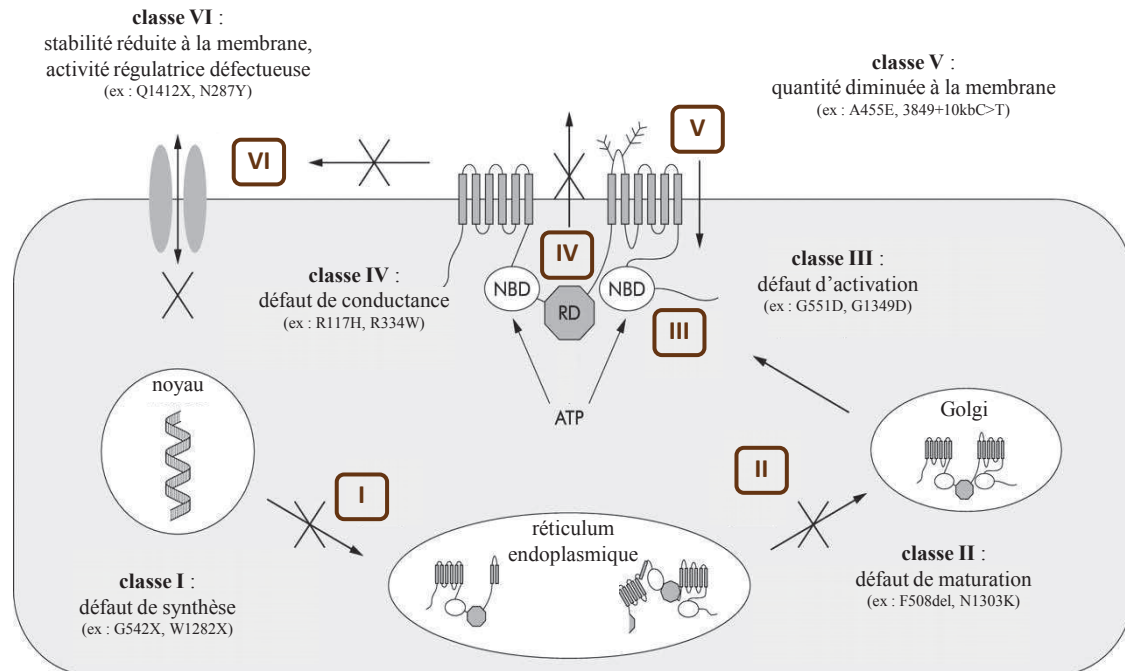


Figure 7 : Représentation schématique des différentes classes de mutations

ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, NBD: domaine de liaison à l'ATP (*nucleotide binding domain*), RD : domaine régulateur (*regulatory domain*)

adaptée de la revue de Witt, 2003

1993). Par la suite, deux autres classes (**classes V et VI**) ont été proposées à partir de **la classe I**, dans un souci d'une meilleure séparation des défauts biochimiques associés aux diverses anomalies génétiques (Haardt *et al.*, 1999) (**Figure 7**).

- les mutations de **classe I** altèrent la biosynthèse de la protéine, résultant en une absence totale ou partielle du canal CFTR à la surface apicale des cellules épithéliales. Cette classe rassemble des mutations non-sens (G542X, W1292X), des mutations d'épissage (1717-1G>A) ou des insertions et délétions décalant la phase de lecture (1078delT), lesquelles entraînent l'apparition d'un codon stop prématuré. La mise en place dans le cytosol du mécanisme NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) pourra conduire à la dégradation des ARNm mutés, empêchant ainsi la synthèse protéique. Dans certains cas, une protéine tronquée et instable, généralement non fonctionnelle, pourra néanmoins être produite, mais elle sera rapidement dégradée (pour revue : Hentze et Kulozik, 1999).

- les mutations de **classe II** perturbent le processus de maturation conformationnelle de la protéine. Ceci se traduit par la présence en quantité fortement réduite du canal CFTR dans la membrane plasmique. Dans cette classe sont retrouvées des micro-délétions telles que la célèbre F508del ou des mutations faux-sens (N1303K), ne modifiant ni le cadre de lecture, ni la liaison à l'ATP. Incapable d'acquiescer un repliement correct dans le RE (réticulum endoplasmique), la protéine mutée ne poursuit pas sa maturation dans l'appareil de Golgi et n'est donc pas adressée à la membrane apicale des cellules épithéliales. Au lieu de cela, la protéine est piégée dans le RE et dirigée vers les voies de dégradation.

- les mutations de **classe III** impactent l'activation de la protéine CFTR. Cette dernière est correctement synthétisée et adressée à la membrane plasmique, mais le processus d'activation est fortement altéré. Le canal présente une probabilité d'ouverture (P_o) très faible. Cette classe inclut des mutations faux-sens généralement localisées dans les domaines de liaison à l'ATP telles que les mutations G551D et G1349D.

- les mutations de **classe IV** altèrent la conductance du canal CFTR. Cette classe regroupe des mutations faux-sens essentiellement situées au niveau de certains segments des domaines transmembranaires participant à la formation et au fonctionnement du pore (R117H, R334W). Les protéines mutées produites sont correctement localisées à la surface apicale des cellules où elles assurent le transport des ions Cl^- . Cependant, elles diffèrent des protéines sauvages par la diminution du flux d'ions traversant le canal et la modification de la sélectivité aux ions Cl^- du pore.

- les mutations de **classe V** conduisent *in fine* à une diminution de la quantité de canaux CFTR normalement fonctionnels à la membrane apicale des cellules épithéliales (biosynthèse réduite). Cette classe rassemble : i) des mutations localisées sur le promoteur, diminuant le taux de transcription, ii) des mutations situées sur les sites d'épissage, conduisant à un épissage aberrant altérant la stabilité des ARNm *CFTR*, ou encore iii) des mutations faux-sens, entraînant un trafic intracellulaire inefficace de la protéine. Parmi celles-ci, peuvent être citées les mutations 3849+10kbC>T (intron 19) et A455E (exon 9).

- les mutations de **classe VI** impactent la stabilité de la protéine CFTR mature dans la membrane plasmique, de même que ces propriétés de protéine régulatrice d'autres canaux et transporteurs. La grande majorité de ces altérations est retrouvée au niveau de l'extrémité C-terminale. Bien que cette région n'apparaisse pas essentielle pour la synthèse et le fonctionnement du CFTR, elle est importante pour le maintien de la protéine canal dans les membranes. Cette extrémité est la cible de protéines à domaine PDZ, notamment certains membres des NHERFs (*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factors*), qui favorisent la stabilité du canal CFTR à la surface cellulaire. Un exemple phare de cette classe est la mutation Q1412X, entraînant la synthèse d'une protéine CFTR tronquée d'environ 70 résidus.

2.3. Les relations génotype-phénotype

En fonction des conséquences engendrées sur les transports transépithéliaux, un autre type de classification peut-être établie pour ces mutations. D'un côté, les mutations des classes I, II, III et VI, entraînant une présence fortement réduite, voire l'absence de protéine CFTR à la membrane plasmique et/ou un important défaut fonctionnel du canal, sont considérées comme des mutations « sévères ». De l'autre, les mutations des classes IV et V, qui permettent de conserver une activité CFTR résiduelle à la surface cellulaire, sont dites « modérées » ou « peu sévères ».

Différentes combinaisons alléliques permettent d'expliquer, en partie, la variabilité phénotypique de la mucoviscidose. La présence d'une mutation dite « sévère » sur chacun des deux allèles conduit à des formes sévères et classiques de la maladie. Ces formes sont associées sur le plan phénotypique à une insuffisance pancréatique (PI, *pancreatic insufficiency*) et à une atteinte pulmonaire débutant dans l'enfance, laquelle est caractérisée par une assez grande variabilité entre les malades. Par ailleurs, l'association d'une mutation « modérée » et d'une mutation « sévère », ou la combinaison de deux mutations « modérées », sont associées à des phénotypes moins sévères. Les patients conservent, en règle générale, une fonction pancréatique exocrine (PS, *pancreatic sufficiency*) et sont colonisés plus tardivement par *P. aeruginosa* (Kristidis *et al.*, 1992, pour revues : Zielenski, 2000, Férec *et al.*, 2012).

Alors que la sévérité des atteintes pancréatiques et génitales apparaît relativement bien corrélée aux mutations du gène *CFTR*, une telle corrélation est bien plus difficile à établir en ce qui concerne les atteintes pulmonaires. Des individus porteurs de mutations identiques pourront présenter une grande variabilité dans l'expression de ces atteintes (pour revue : Cutting, 2005). Diverses études suggèrent l'influence de facteurs environnementaux et de gènes modificateurs (variants génétiques en dehors du locus *CFTR*) dans l'expression phénotypique de la maladie pulmonaire. À titre d'exemple, des associations significatives ont été rapportées entre des variants des gènes codant des protéines engagées dans la réponse immunitaire et inflammatoire [TGFβ1 (*transforming growth factor beta 1*), TNFα (*tumor necrosis factor alpha*), interleukines 8 et 10] et la sévérité de l'atteinte respiratoire (Drumm *et al.*, 2005, Brouard *et al.*, 2005, Corvol *et al.*, 2008, Hillian *et al.*, 2008, pour revue : Férec *et*

al., 2012). L'identification de ces gènes modificateurs s'avère essentielle pour une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie.

Enfin, à côté des formes de mucoviscidose dites classiques, l'étude des relations génotype-phénotype a également permis d'identifier des formes modérées de la maladie (atypiques), souvent diagnostiquées plus tardivement et mono-symptomatiques. Ces entités cliniques sont regroupées sous le terme de CFTR-RD (*CFTR-related disorder*) ou pathologie liée au gène *CFTR*. Elles sont associées à un dysfonctionnement de la protéine CFTR mais ne remplissent pas les critères diagnostiques de la mucoviscidose. Parmi ces entités, sont retrouvées : la stérilité masculine par absence bilatérale des canaux déférents (Dumur *et al.*, 1990, Dumur *et al.*, 1995, Chillon *et al.*, 1995), certaines formes de pancréatites chroniques (Castellani *et al.*, 2001, Audrézet *et al.*, 2002) ou encore de dilatation des bronches (Pignatti *et al.*, 1995, Girodon *et al.*, 1997).

3. Structure de la protéine CFTR

Dès le clonage du gène *CFTR* en 1989, la séquence primaire de la protéine CFTR a été déterminée et alignée avec celles de protéines déjà référencées. Ces études comparatives ont révélé que le CFTR, glycoprotéine de 1480 acides aminés, appartient à la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*).

3.1. Les transporteurs ABC

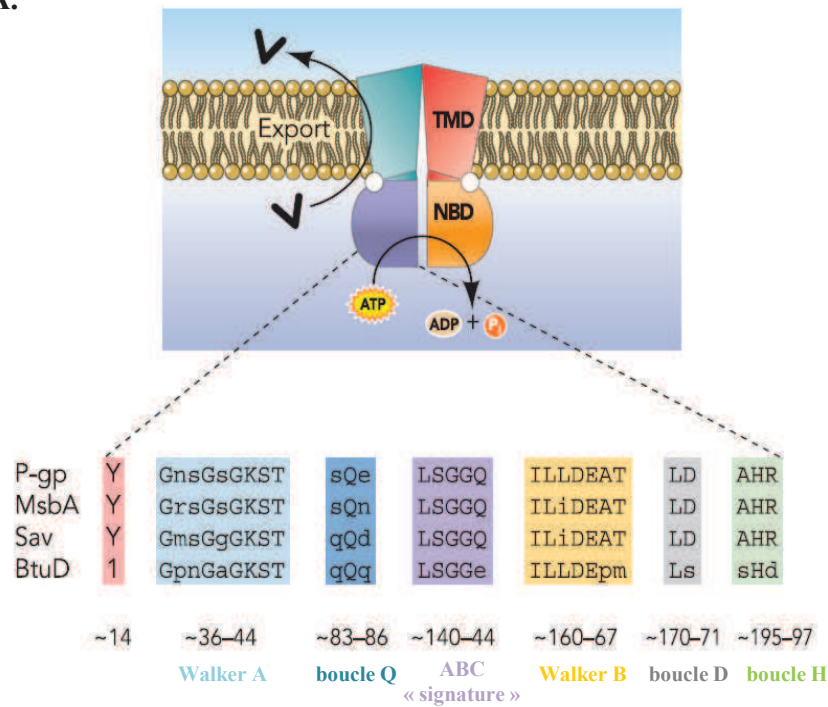
3.1.1. Généralités

Les transporteurs ABC constituent une superfamille de protéines. Ils ont été identifiés en grand nombre dans toutes les espèces, des procaryotes aux eucaryotes inférieurs et supérieurs. Ces protéines transmembranaires présentent une particularité étonnante : elles couplent la fixation et l'hydrolyse de l'ATP directement au transport de molécules à travers les membranes biologiques (pour revues : Higgins, 1992, Linton, 2007).

Ces protéines représentent l'une des plus grandes familles de transporteurs transmembranaires et les analyses de séquences suggèrent que tous les membres dériveraient d'une protéine ancestrale commune (Higgins *et al.*, 1986, Saurin *et al.*, 1999). A ce jour, près d'une cinquantaine de transporteurs ABC ont été découverts chez l'Homme, classés en 7 familles (ABCA à ABCG) (pour revues : Dean *et al.*, 2001a,b, Dean et Annilo, 2005).

Les transporteurs ABC sont impliqués dans le transport d'une grande variété de substances (substrats) telles que des acides aminés, des peptides, des ions, des sucres, des hormones ou encore des xénobiotiques, des lipides et certains métaux lourds (pour revue : Higgins, 1992). Leur engagement dans divers processus cellulaires, comme la détoxification cellulaire et l'homéostasie osmotique et lipidique, et dans de nombreuses pathologies humaines (maladies génétiques, phénomènes de résistance aux drogues), place ces protéines membranaires parmi les plus étudiées à l'heure actuelle (Dean *et al.*, 2001a,b).

A.



B.

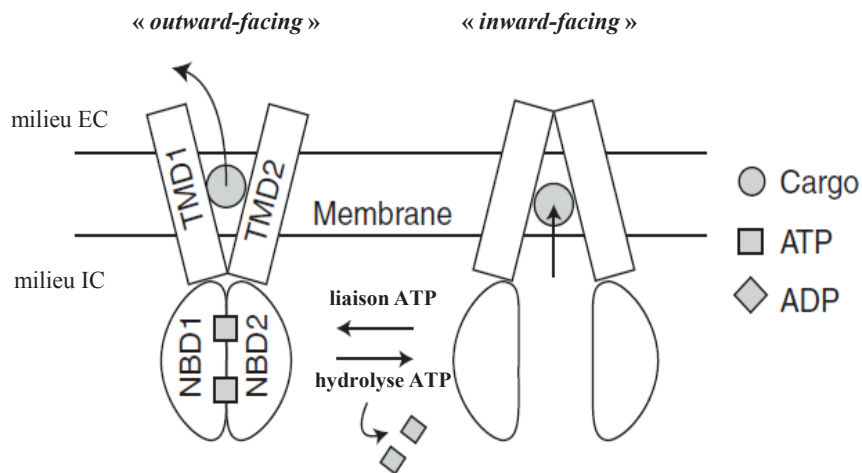


Figure 8 (A-B) : Les transporteurs ABC : structure et mode de fonctionnement

A. Topologie générale d'un transporteur ABC et motifs caractéristiques des domaines de liaison aux nucléotides (NBDs). **B.** Est schématisé ici le cas d'un exportateur ABC. Celui-ci présente, en absence d'ATP, une configuration dite « *inward-facing* » (position fermée) avec les NBDs éloignés l'un de l'autre et le site de liaison au substrat (cargo) accessible au niveau des TMDs (côté cytoplasmique). La fixation de deux molécules d'ATP au niveau des motifs Walker A et B induit la dimérisation des NBDs selon une configuration tête-bêche, laquelle s'accompagne d'un changement conformationnel des TMDs nécessaire à l'exportation du substrat dans l'environnement extracellulaire. L'exportateur présente alors une configuration dite « *outward-facing* » (position ouverte). Par la suite, l'hydrolyse de l'ATP et la libération de l'ADP entraîne la dissociation de l'hétérodimère NBD1/NBD2 et la restauration de la position fermée de l'exportateur.

ABC : *ATP-binding cassette*, ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate, EC : extracellulaire, IC : intracellulaire, NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), TMD1 et TMD2 : domaines transmembranaires (TMDs, *transmembrane domains*)

→ P-gp (glycoprotéine P), MsbA, Sav et BtuD correspondent à différents transporteurs ABC.

A. adaptée de la revue de Linton, 2007, **B.** adaptée de la revue de Hwang et Kirk, 2013

Au sein de cette superfamille, le CFTR est peut-être le transporteur qui suscite le plus grand intérêt, les mutations du gène *CFTR* étant responsables de la mucoviscidose.

3.1.2. Topologie générale des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC présentent une très grande conservation dans leur séquence et dans leur organisation structurale. Ils sont composés de quatre domaines associés à la membrane plasmique, parmi lesquels sont retrouvés deux domaines hydrophobes, appelés domaines transmembranaires (TMDs, *transmembrane domains*). Ils sont constitués, dans la plupart des cas, de six segments transmembranaires et forment le site de reconnaissance du substrat, la nature des segments transmembranaires déterminant le type de molécules transportées. Les deux autres domaines sont impliqués dans la fixation des molécules d'ATP, dont le site de liaison est localisé au niveau des motifs Walker A et B. Ils sont appelés domaines de liaison aux nucléotides (NBDs, *nucleotide binding domains*) et localisés à la périphérie de la membrane (pour revues : Higgins, 1992, Linton, 2007).

Les NBDs contiennent des motifs caractéristiques (**Figure 8.A**), très conservés parmi les membres de cette famille (Walker *et al.*, 1982, pour revue : Linton, 2007) :

- les motifs Walker A et B : ces séquences ne sont pas propres aux transporteurs ABC mais sont communes à de nombreuses protéines fixant des nucléosides triphosphates ;
- le motif C : situé entre les motifs Walker A et B, il constitue la « signature » spécifique des transporteurs ABC ;
- les boucles D, H et Q (*D*-, *H*-, *Q-loop*) : également propres à la famille des transporteurs ABC.

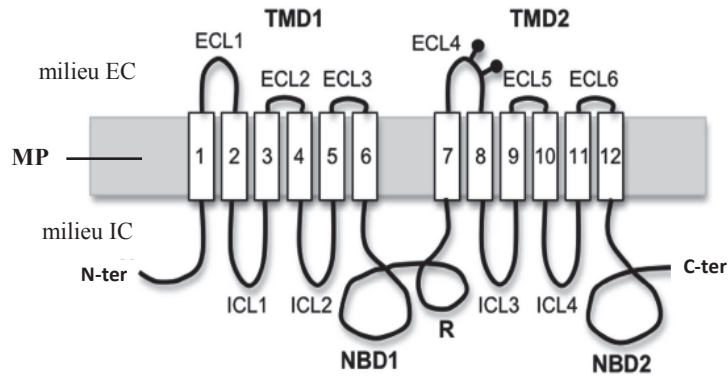
Ces transporteurs associent le transit de molécules de part et d'autre de la membrane plasmique à la liaison et à l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBDs (**Figure 8.B**). Cependant, pour certains représentants, la présence d'autres domaines prenant part à ce processus a été décrite (pour revue : Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). C'est notamment le cas de la protéine CFTR (nomenclature ABCC7, *ATP-binding cassette transporter sub-family C member 7*), qui est la seule à présenter un domaine accessoire cytoplasmique, appelé domaine régulateur ou domaine R. Ce domaine possède de nombreuses séquences consensus de phosphorylation l'impliquant dans la régulation fonctionnelle du CFTR (voir § 3.2.4, Riordan *et al.*, 1989). De plus, parmi la multitude de transporteurs ABC répertoriés, le CFTR est l'unique membre à fonctionner comme un canal ionique (Anderson *et al.*, 1991b).

3.2. Les différents domaines de la protéine CFTR

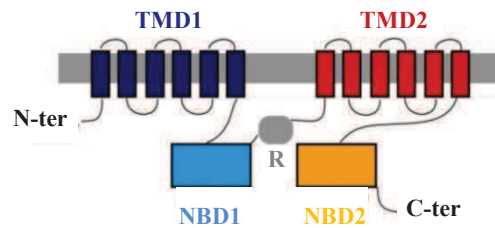
Seule une structure cristallographique du CFTR à très basse résolution est disponible à ce jour (Rosenberg *et al.*, 2004). Cependant, grâce à l'étude de la structure primaire et du profil d'hydrophobicité, une topologie générale de la protéine canal a été déduite.

De manière similaire à la plupart des transporteurs ABC, la protéine CFTR est composée de : deux domaines transmembranaires [TMD1 et TMD2, ou MSD1 et MSD2, (MSDs, *membrane spanning domains*)], deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD1 et NBD2) et d'un domaine régulateur R,

A.



B.1



B.2

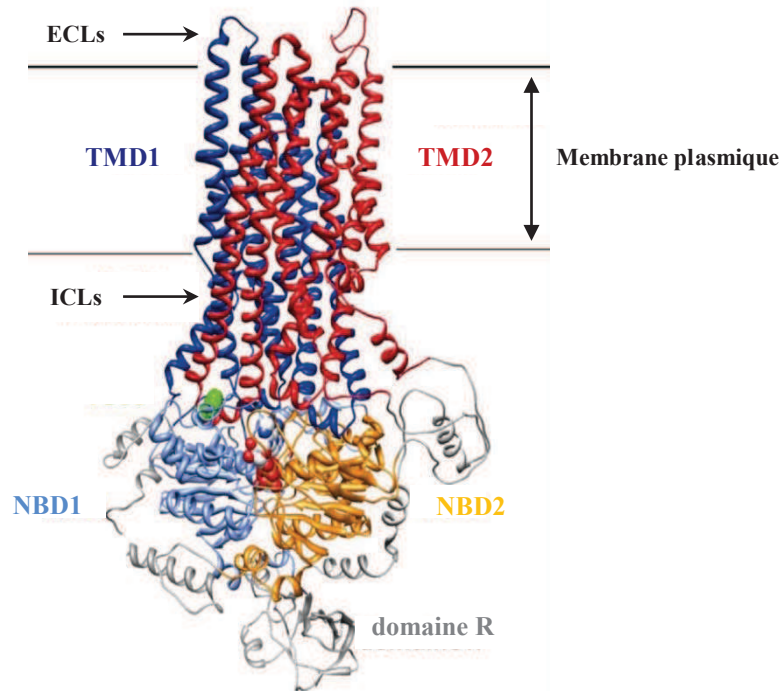


Figure 9 (A-B) : Les différents domaines de la protéine CFTR

A. & B.1 Représentation simplifiée de la topologie membranaire de la protéine CFTR. **B.2** Modélisation de la protéine CFTR entière proposée par homologie suite à l'obtention de la structure complète du transporteur ABC bactérien Sav1866. Le canal est représenté ici en configuration ouverte (« *outward-facing* »). Le code couleur utilisé est : TMD1 (bleu foncé), TMD2 (rouge), NBD1 (bleu clair), NBD2 (orange), domaine R (gris) et résidu F508 (vert).

(●) : chaînes oligosaccharidiques branchées sur l'ECL4

ABC : *ATP-binding cassette*, ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, C-ter : extrémité C-terminale, EC : extracellulaire, ECLs : boucles extracellulaires (*extra-cellular loops*), IC : intracellulaire, ICLs : boucles intracytoplasmiques (*intra-cellular loops*), MP : membrane plasmique, NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), N-ter : extrémité N-terminale, R : domaine R (*regulatory domain*), TMD1 et TMD2 : domaines transmembranaires (TMDs, *transmembrane domains*)

A. d'après la revue de Kim et Skach, 2012, B. d'après I. Callebaut et al., CNRS UMR7590, Paris

particularité du CFTR (Riordan *et al.*, 1989). Les extrémités amino- et carboxy-terminales sont situées dans le cytoplasme de la cellule (**Figure 9**). D'après le profil d'hydrophobicité, 77 % des 1480 acides aminés composant la protéine CFTR sont cytoplasmiques, 19 % sont retrouvés dans les segments transmembranaires et 4 % dans les boucles extracellulaires (Akabas *et al.*, 1997).

3.2.1. Les domaines transmembranaires (TMDs)

L'organisation et le rôle des TMDs ne sont pas encore complètement élucidés. Il est toutefois admis que l'assemblage des douze segments transmembranaires (TM1 à TM12) contribue à la formation d'un pore de sélectivité anionique et de faible conductance (6-10 pS) (pour revue : Sheppard et Welsh, 1999).

a. Structure

Les premières études structurales comparatives de la protéine CFTR avaient prédit deux domaines transmembranaires, composés chacun de six segments transmembranaires (TM1 à TM6 pour TMD1 et TM7 à TM12 pour le TMD2) organisés en hélices-alpha (α) et reliés entre eux par des boucles intracytoplasmiques et extracellulaires. Depuis, les données structurales de basse résolution (Rosenberg *et al.*, 2004) ainsi que les modélisations tridimensionnelles (3D) ont confirmé la structure secondaire hélicoïdale de ces domaines (Mornon *et al.*, 2008; Serohijos *et al.*, 2008) (**Figures 9.B et 10**).

b. Le pore du canal CFTR

Même si à l'heure actuelle la connaissance du pore reste largement incomplète, d'énormes progrès ont été réalisés. Sa sélectivité ionique a pu être caractérisée et de nombreux modèles biophysiques du pore ont été développés. De plus, la mutagenèse dirigée a permis d'identifier les hélices transmembranaires (ainsi que certains de leurs résidus) impliquées dans la formation du pore et influençant sa sélectivité (pour revue : Hwang et Kirk, 2013).

Le pore du canal serait composé d'une région étroite dans laquelle est retrouvé le filtre de sélectivité anionique. Cette région est bornée par deux vestibules : intra et extracellulaires (pour revue : Linsdell, 2006). Déjà évoquée dès 2006, de récentes études confirment l'hypothèse selon laquelle l'unique « porte » du CFTR serait plutôt localisée dans la partie extracellulaire du pore (Bai *et al.*, 2011, Wang et Linsdell, 2012).

Parmi les douze segments transmembranaires, il est aujourd'hui bien établi que le segment TM6 joue un rôle dominant dans l'architecture du pore (Linsdell *et al.*, 2000, McCarty et Zhang 2001, Cui *et al.*, 2008, pour revue : Hwang et Kirk, 2013). L'implication du segment TM1 et plus récemment des segments TM5, TM11 et TM12 a également été suggérée dans la formation de ce pore (Zhang *et al.*, 2000, Fatehi et Linsdell, 2009, Bai *et al.*, 2011, pour revue : Hwang et Kirk 2013). Il est actuellement admis que le diamètre minimal du pore du canal est de 5.3 angströms (Linsdell *et al.*, 1997)

Plusieurs acides aminés semblent jouer un rôle essentiel dans le fonctionnement du pore. La lysine K95 (TM1), les arginines R303 (TM5) et R352 (TM6) participant au vestibule interne, attireraient les anions du milieu intracellulaire vers le pore (Anderson *et al.*, 1991b, Aubin et Linsdell, 2006, Zhou

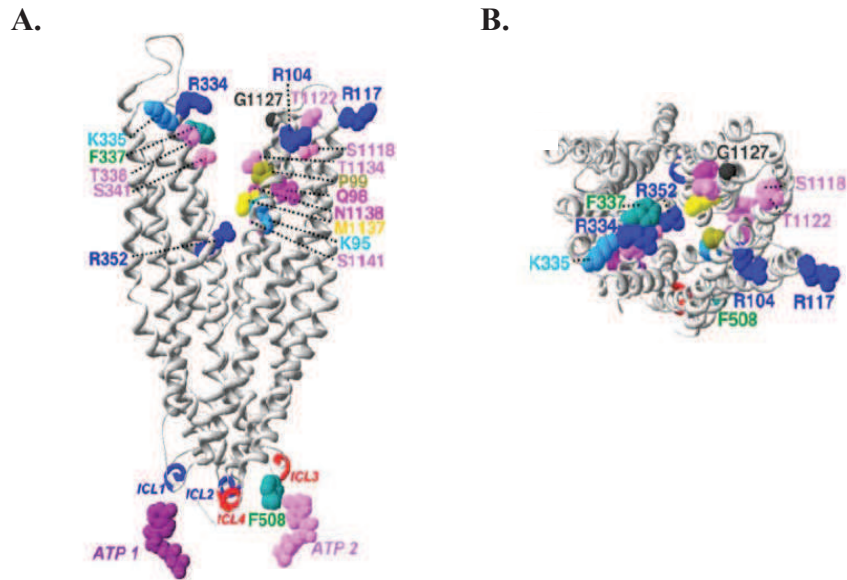


Figure 10 (A-B) : Modélisation 3D de l'organisation des segments transmembranaires du CFTR

A. & B. Représentation du canal CFTR en configuration ouverte (« *outward-facing* »), vue de côté (**A.**) et de dessus (**B.**). L'organisation alpha-hélicoïdale des segments est ici représentée par des rubans gris, sur lesquels sont identifiés les résidus critiques pour la formation du pore, sa perméabilité ou encore sa conductance. Apparaissent également les hélices de couplage des quatre ICLs : les ILC1 et 2 (TMD1) sont représentées en bleu et les ICL3 et 4 (TMD2) en rouge. Le résidu F508 (vert) ainsi que deux molécules d'ATP (rose clair et foncé) sont aussi mentionnés sur cette modélisation.

ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, ICLs : boucles intracytoplasmiques (*intra-cellular loops*), TMD1 et TMD2 : domaines transmembranaires (TMDs, *transmembrane domains*), 3D : tridimensionnelle

A. & B. d'après Mornon et al., 2009

et al., 2010, pour revue : Linsdell, 2006). Participant au vestibule extérieur, l'arginine R334 (TM6) attirerait les anions du milieu extérieur vers le pore (Smith *et al.*, 2001). La lysine K335, l'arginine R337, la thréonine T338 ainsi que la sérine S341, localisées dans le segment TM6, apparaissent également jouer un rôle majeur dans la séquence de perméabilité du canal CFTR (Linsdell *et al.*, 2000, McCarty et Zhang 2001, Ge *et al.*, 2004, pour revue : Hwang et Kirk, 2013) (**Figure 10**).

3.2.2. Les boucles extracellulaires et intracytoplasmiques

a. Les boucles extracellulaires

Les boucles extracellulaires (ECLs, *extra-cellular loops*), au nombre de six dans la protéine CFTR (ECL1 à 6), connectent les segments transmembranaires entre eux (**Figure 9**). En plus de ce rôle physique, certains résidus des ECLs seraient aussi impliqués dans la modulation de l'activité du canal CFTR. Un travail récent mené par Billet et collaborateurs met en évidence l'importance de résidus localisés dans les boucles extracellulaires ECL2 et ECL4. A travers cette étude, deux paires d'acides aminés, spatialement très proches, ont été identifiées : E267-K1060 et S263-V1056. Alors que des mutations au niveau du couple E267-K1060 diminuent les courants chlorure (courants Cl⁻) médiés par le canal CFTR, des modifications du couple S263-V1056 les augmentent (Billet *et al.*, 2013b).

La 4^{ème} boucle extracellulaire, qui relie les segments TM7 et TM8, présente deux sites de N-glycosylation constitués par les résidus asparagine situés en positions 894 et 900 (pour revues : Riordan, 1993, Sheppard et Welsh, 1999) (**Figure 9.A**). Branchées sur l'ECL4, les chaînes oligosaccharidiques déterminent, en fonction de leurs modifications, le stade de maturation de la protéine CFTR.

b. Les boucles intracytoplasmiques

Tout comme les ECLs, les boucles intracytoplasmiques (ICLs, *intra-cellular loops*) relient les segments transmembranaires. Elles sont au nombre de quatre dans la protéine CFTR (ICL1 à ICL4) (**Figure 9**). Les modèles structuraux établis pour la protéine CFTR entière révèlent que ces ICLs sont constituées des longues extensions alpha-hélicoïdales des segments transmembranaires (Mornon *et al.*, 2008, Serohijos *et al.*, 2008). Ces travaux démontrent également de fortes interactions entre les ICLs et les NBDs, lesquelles s'expliquent par la présence d'hélices de couplage dans les ICLs (**Figure 10.A**). Ces liaisons permettent la transmission des signaux des NBDs aux TMDs lors des phénomènes d'ouverture/fermeture du canal (Mornon *et al.*, 2009, pour revue : Hwang et Sheppard 2009).

Ces boucles seraient également impliquées dans certaines régulations pharmacologiques du canal. La substitution de la lysine 978 par un résidu non chargé perturbe la sensibilité de la protéine à la glibenclamide, un inhibiteur du CFTR (Melin *et al.*, 2007).

Enfin, il apparaît que les ICLs participent aussi à l'adressage et à la stabilité de la protéine CFTR à la membrane apicale. Une mutation localisée dans l'ICL2 (N287Y) entraîne l'augmentation de l'endocytose de la protéine et diminue de ce fait son temps de résidence dans la membrane plasmique (Silvis *et al.*, 2003).

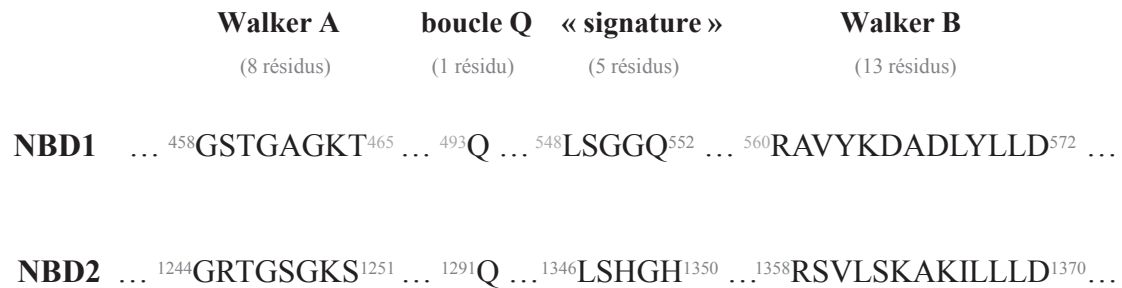


Figure 11 : Séquences des différents motifs des NBDs de la protéine CFTR

Le motif « signature » correspond au motif C, propre aux transporteurs ABC. La position des résidus apparaît grisée et est indiquée en exposant.

ABC : *ATP-binding cassette*, ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, NBDs : domaine de liaison à l'ATP (*nucleotide binding domains*)

adaptée de la thèse de A. Billet, 2010 (référence tel non disponible) et réalisée d'après les alignements de séquences de Mornon et al., 2009

3.2.3. Les domaines de liaison aux nucléotides (NBDs)

Le CFTR est composé de deux domaines de liaison à l'ATP : NBD1 et NBD2. Bien que cela soit encore discuté aujourd'hui, NBD1 s'étendrait des résidus 433 à 638 (Chan *et al.*, 2000) et NBD2, des résidus 1219 à 1382 (<http://www.genet.sickkids.on.ca>).

a. Structure et séquences consensus

D'après les travaux de Bianchet et collaborateurs, la structure secondaire des NBDs consiste en un feuillet bêta (β) central entouré par des hélices α (Bianchet *et al.*, 1997). Par la suite, des structures à haute résolution des NBD1 murin et humain ont été proposées (Lewis *et al.*, 2004).

De manière identique aux autres membres de la famille des transporteurs ABC, le NBD1 du CFTR est composé d'un noyau central analogue à l'ATPase de type F1, constitué par deux séquences non contiguës. Ces dernières sont localisées dans les régions amino- et carboxy-terminales, le site de liaison à l'ATP étant retrouvé au niveau de l'extrémité N-terminale. NBD1 se compose également d'un sous-domaine alpha-hélicoïdal contenant le résidu phénylalanine F508 (pour revue : Molinski *et al.*, 2012). Les travaux de Lewis et associés ont aussi révélé la présence de trois régions supplémentaires propres au NBD1 du CFTR, dont une située à l'extrémité N-terminale (résidus 404 à 436) et une autre en C-terminale (résidus 638 à 673). Ces deux régions, nommées « insertion régulatrice » et « extension régulatrice », sont très flexibles et présentent des résidus sérine phosphorylables (S422, S660 et S670) par la protéine kinase A (PKA). Le rôle de ces régions n'est pas encore entièrement clarifié (Lewis *et al.*, 2004, pour revues : Molinski *et al.*, 2012, Kim et Skach, 2012).

Les NBDs du CFTR présentent, comme ceux des autres transporteurs ABC, des séquences consensus très conservées, comme les motifs Walker A et B et le motif C (Walker *et al.*, 1982, pour revue : Hwang et Sheppard, 2009) (**Figure 11**):

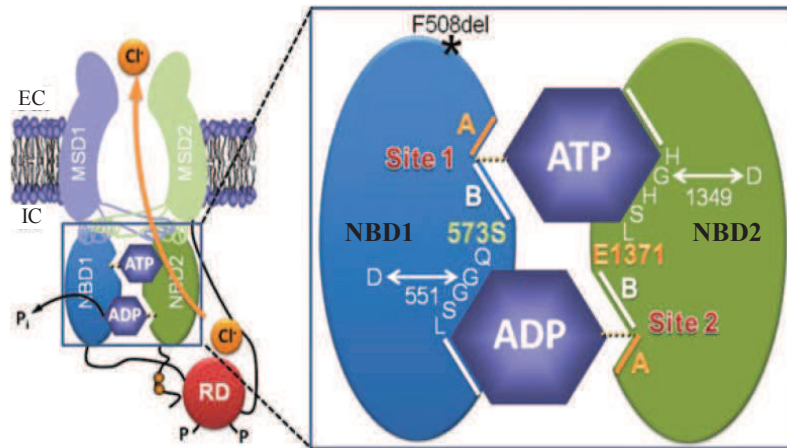
- le motif Walker A : G-X-X-G-X-G-K-S/T (x représentant n'importe quel acide aminé) ;
- le motif Walker B : R-X₇-h-h-h-h-D (h représentant un résidu hydrophobe) ;
- le motif C, propres aux transporteurs ABC : LSGGQ et LSHGH (pour NBD1 et NBD2 respectivement).

b. Fonction des NBDs

Ces domaines constituent des sites de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, impliqués dans la régulation des mécanismes d'ouverture/fermeture de la protéine CFTR. Longuement discuté, il est maintenant accepté que l'action des NBDs nécessite la formation d'un hétérodimère. Suite à la phosphorylation du domaine R et à la fixation d'une molécule d'ATP sur chacun des NBDs, ces derniers s'assemblent en dimère selon un modèle d'organisation spatiale tête-bêche (« head-to-tail »). Cette dimérisation est suivie d'un changement conformationnel des segments transmembranaires, lequel s'accompagne de l'ouverture du canal (Vergani *et al.*, 2005, Mense *et al.*, 2006).

Cette hétérodimérisation piège et maintient à son interface les deux molécules d'ATP (**Figure 12**). Chaque site de liaison (sites I et II) est ainsi composé des motifs Walker A et B de l'un

A.



B.

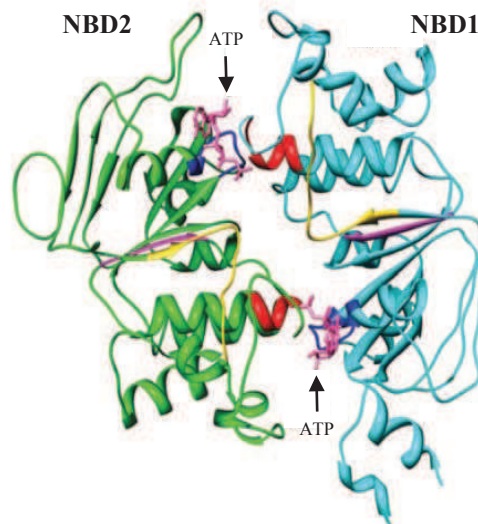


Figure 12 (A-B) : Modèles d'organisation spatiale tête-bêche des NBDs du CFTR

A. Représentation schématique de l'organisation des NBDs dans une configuration ouverte du canal CFTR. Sont localisées quelques-unes des mutations les plus fréquemment observées au niveau des ces domaines, à savoir la G551D (site 2), la G1349D (site 1) et la F508del (surface du NBD1, interface NBD1/ICL4). **B.** Modélisation 3D de l'hétérodimère NBD1/NBD2 humain (vue de dessus), par des études de « *protein-protein docking* ». Gardant le même code couleur que la figure précédente, le NBD1 apparaît en bleu clair (cyan) et le NBD2 en vert. Les motifs Walker A et B ainsi que la séquence « signature » et la boucle Q sont également visualisés, respectivement en bleu foncé, magenta, rouge et jaune. Les molécules d'ATP sont quand à elles représentées en rose et indiquées par les flèches noires.

ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, Cl⁻ : ion chlorure, EC : milieu extracellulaire, IC : milieu intracellulaire, ICL4 : boucle intracytoplasmique n°4 (*intra-cellular loop*), NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), MSD1 et MSD2 : domaines transmembranaires (MSDs, *membrane-spanning domains*), P : phosphorylation du domaine R, Pi : phosphate inorganique, RD : domaine régulateur (*regulatory domain*), 3D : tridimensionnelle

A. & B. d'après la revue de Hwang et Sheppard, 2009

des NBDs et du motif C du NBD partenaire (Lewis *et al.*, 2004, pour revue : Hwang et Sheppard, 2009) :

- site I, dit site « non-canonique » : formé par les motifs Walker A et B du NBD1 et le motif C (LSHGH) du NBD2 ;
- site II, dit site « canonique » : formé par les motifs Walker A et B du NBD2 et le motif C (LSGGQ) du NBD1.

Contrairement à d'autres transporteurs ABC, les deux NBDs du CFTR ne présentent pas la même activité hydrolytique. Cette dernière étant nettement négligeable pour le site I, en comparaison avec celle observée pour le site II (Aleksandrov *et al.*, 2002). Cela pourrait s'expliquer par des différences dans la composition en acides aminés entre les NBDs, comme la présence d'une base catalytique (E1371) uniquement retrouvée dans la partie distale du motif Walker B du site II (Tomblin *et al.*, 2004) (**Figure 12.A**).

La connexion entre l'activité ATPasique des NBDs et le fonctionnement du canal CFTR a été interprétée de différentes façons. La majorité des études s'accorde sur le fait que la liaison et l'hydrolyse de l'ATP au niveau des NBDs représentent les événements principaux du cycle d'ouverture/fermeture du canal CFTR. Néanmoins, il semble que le rôle des sites I et II soit différent et complémentaire.

Des mutations au niveau de ces domaines auront de graves conséquences, impactant le processus de biosynthèse de la protéine (maturation conformationnelle) jusqu'à l'activité du canal CFTR. Peut être citée la délétion de la phénylalanine F508 (F508del), limitant considérablement l'adressage de la protéine CFTR à la membrane. Ce résidu, situé à la surface du NBD1, serait engagé dans un contact essentiel entre NBD1 et TMD2 (par l'intermédiaire de l'ILC4), impliqué dans le processus d'assemblage et l'activité du canal à la membrane (Serohijos *et al.*, 2008) (**Figure 13**). L'importance du motif C peut être soulignée par les effets sévères de mutations telles que la G551D, perturbant l'activation du canal CFTR à la membrane plasmique (Cutting *et al.*, 1990).

Une étude rapporte que la délétion de l'ensemble du NBD2 n'empêche ni la maturation, ni l'adressage des protéines CFTR mutées à la membrane, où elles montrent une stabilité similaire aux protéines CFTR sauvages (CFTR-wt, *wild-type*). Toutefois, cette délétion impacterait la Po du canal (Cui *et al.*, 2007). Bien qu'il soit important pour l'activité du CFTR, NBD2 n'apparaît pas essentiel pour la biogenèse de la protéine et pour son export à partir du RE. Enfin, en plus d'être impliquée dans l'effet pharmacologique des composés benzo[c]quinolizinium (MPB), l'extrémité C-terminale du NBD1 influencerait l'adressage et l'activité du canal CFTR (Billet *et al.*, 2010).

3.2.4. Le domaine régulateur (domaine R)

Le domaine régulateur, qui sépare NBD1 et TMD2, est un domaine spécifique à la protéine CFTR. Il fut nommé ainsi car l'analyse de sa séquence primaire a révélé la présence de nombreuses séquences consensus pour la phosphorylation par la PKA (Riordan *et al.*, 1989).

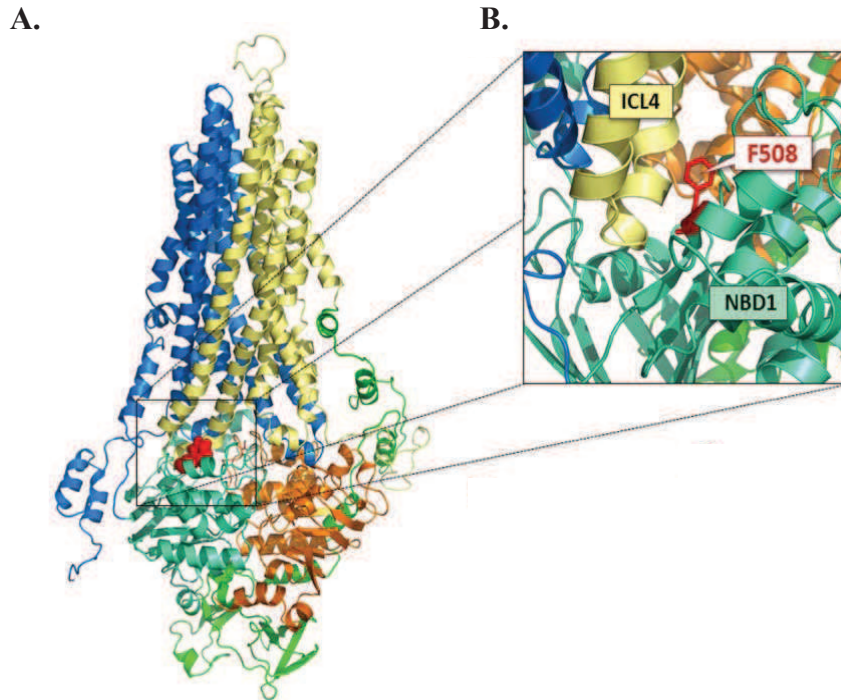


Figure 13 (A-B) : Le résidu F508 impliqué dans un contact essentiel entre NBD1 et TMD2

A. Modélisation de la protéine CFTR entière proposée par homologie suite à l'obtention de la structure complète du transporteur ABC bactérien Sav1866. Le code couleur utilisé est le suivant : TMD1 (bleu), TMD2 (jaune), NBD1 (cyan), NBD2 (orange), domaine R (vert) et résidu F508 (rouge). **B.** Zoom sur la zone de contact entre NBD1 et TMD2, laquelle s'établit via l'hélice de couplage de l'ICL4. Le résidu F508 est localisé à l'interface ICL4/NBD1.

ABC : *ATP-binding cassette*, ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, ICL4 : boucle intracytoplasmique n°4 (*intra-cellular loop*), NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), TMD1 et TMD2 : domaines transmembranaires (TMDs, *transmembrane domains*)

d'après la revue de Molinski et al., 2012

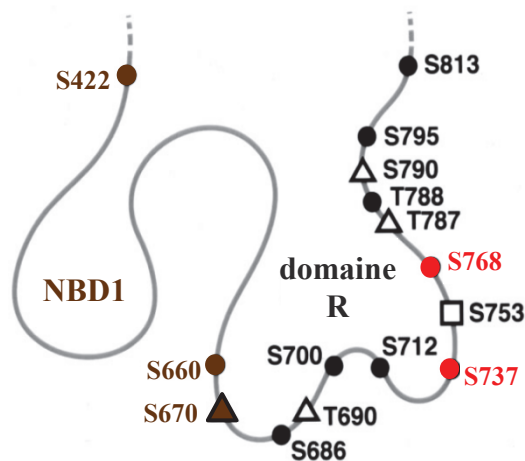


Figure 14 : Localisation des résidus sérine et thréonine phosphorylables par la PKA

Quinze résidus potentiellement phosphorylables par la PKA ont été identifiés. Majoritairement localisés sur le domaine R, ils sont ici représentés schématiquement par des cercles noirs (sites dibasiques) et des triangles et carrés blancs (sites monobasiques). La plupart des phosphosérines sont activatrices, cependant les résidus sérine S737 et S768, représentées par des cercles rouges, s'avèrent être inhibitrices. Trois résidus sérine potentiellement phosphorylables par la PKA sont, quant à eux, localisés au niveau du NBD1. Il s'agit des résidus S422, S660 et S670, représentés schématiquement par des cercles et triangles marrons.

domaine R → (●), (●) : sites dibasiques, phosphosérines activatrices / *inhibitrices*, (Δ & □) : sites monobasiques
NBD1 → (●) : sites dibasiques, (▲) : sites monobasiques

ATP : adénosine triphosphate, NBD1 : domaine de liaison à l'ATP (*nucleotide binding domain*), PKA : protéine kinase A

adaptée de la revue de Seibert et al., 1999

a. Structure du domaine R

Initialement délimité par les résidus 588 et 855 (Riordan *et al.*, 1989), des études plus récentes mentionnent que ce domaine s'étalerait des résidus 634 à 835 (Chan *et al.*, 2000, Csanady *et al.*, 2000, <http://www.genet.sickkids.on.ca>).

Dès 1994, une étude a suggéré que ce domaine R serait en fait constitué de deux sous-domaines : RD1 et RD2 (Dulhanty et Riordan, 1994). S'étalant des résidus 634 à 672, RD1 présente une séquence hautement conservée entre les espèces. Ce sous-domaine serait impliqué dans la maturation du CFTR mais également dans l'ouverture du canal, en modulant des interactions dynamiques entre NBD1 et les sites de phosphorylation du domaine R (Pasyk *et al.*, 1998). D'après les structures cristallographiques de Lewis et associés, ce domaine correspondrait à l'« extension régulatrice » du NBD1 (Lewis *et al.*, 2004). S'étalant des résidus 672 à 835, RD2 présente, quant à lui, une séquence très variable entre les espèces. La plupart des résidus sérine phosphorylables étant localisés dans ce sous-domaine, RD2 possède un rôle essentiel dans l'activation du canal CFTR (Rich *et al.*, 1993).

Une étude structurale du domaine R rapporte que ce domaine ne possède pas de repliement précis, mais plutôt une structure lâche. Ceci lui permettrait d'interagir avec de multiples résidus localisés sur d'autres domaines du CFTR (Ostedgaard *et al.*, 2000).

b. Sites de phosphorylation

Le domaine R est caractérisé par la présence de nombreuses séquences consensus potentiellement phosphorylables par la PKA (**Figure 14**). Huit séquences dibasiques de type R-R/K-X-S/T et quatre séquences monobasiques de type R/K-X-S/T sont décrites pour la PKA tout le long du RD2 (Riordan *et al.*, 1989, pour revue : Seibert *et al.*, 1999). Concernant les séquences dibasiques, les résidus sont localisés en position S686, S700, S712, S737, S768, T788, S795 et S813. Les résidus S/T phosphorylables des séquences monobasiques sont retrouvés en position S690, S753, T787, S790. Cinq résidus sérine sont susceptibles d'être phosphorylés *in vivo* par la PKA : S700, S737, S768, S795 et S813. À noter aussi la présence de trois résidus sérine dans NBD1 : S422, S660 et S670. La sérine S660, localisée comme la sérine S670 dans l'« extension régulatrice » du NBD1, serait potentiellement phosphorylable *in vivo* par la PKA (Cheng *et al.*, 1991, Picciotto *et al.*, 1992, Hegedus *et al.*, 2009). Il est admis que la phosphorylation de ces multiples sites par la PKA entraîne des effets additifs sur l'activité du canal. Aucun site n'apparaît être essentiel. Des travaux démontrent que les canaux CFTR deviennent complètement insensibles à la PKA seulement après l'élimination de quinze sites de phosphorylation (Hegedus *et al.*, 2009, pour revues : Seibert *et al.*, 1999, Hwang et Kirk, 2013).

La plupart de ces phosphosérines sont activatrices, mais certaines s'avèrent être inhibitrices. C'est notamment le cas des résidus sérine S737 et S768 (**Figure 14**), la perturbation de ces sites augmentant l'activité du CFTR (Wilkinson *et al.*, 1997, Csanady *et al.*, 2005). La sérine S768 serait également un site reconnu par la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK, *AMP-activated protein kinase*), sa phosphorylation inhibant la stimulation du CFTR par la PKA (Kongsuphol *et al.*, 2009, King *et al.*, 2009).

Le rôle principal du domaine R est de moduler l'activation de la protéine CFTR, sa phosphorylation par la PKA étant un prérequis pour l'ouverture du canal (pour revues : Gadsby et Nairn, 1999a,b, Ostedgaard *et al.*, 2001). D'autres protéines kinases tiendraient également un rôle dans ce processus : en particulier la protéine kinase C (PKC) qui serait capable de potentialiser l'activation du CFTR par la PKA (Chappe *et al.*, 2004). Des phosphatases comme PP2A et PP2C (protéines phosphatases 2, groupe A et C) seraient, quant à elles, impliquées dans la désactivation du canal CFTR (Berger *et al.*, 1993, Becq *et al.*, 1994).

3.2.5. Les extrémités de la protéine CFTR

a. L'extrémité N-terminale

Cette extrémité, qui s'étendrait des résidus 1 à 80, joue un rôle important dans l'adressage et la régulation de l'activité du canal CFTR. Des protéines CFTR mutées (délétion totale ou partielle de la queue N-terminale) sont correctement synthétisées mais se montrent incapables de quitter le RE et, de ce fait, d'atteindre la membrane plasmique (Prince *et al.*, 1999). L'extrémité N-terminale influencerait également l'ouverture du canal en contrôlant la phosphorylation dépendante de la PKA du domaine R, ceci par l'intermédiaire d'interactions interdomaines (Naren *et al.*, 1999). Enfin, il est aussi connu que la queue N-terminale du CFTR est capable d'interagir avec d'autres protéines, comme la syntaxine 1A (protéine SNARE, *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) et les filamines. Ces interactions sont impliquées dans la régulation de l'activité et la stabilité du canal CFTR à la membrane apicale.

b. L'extrémité C-terminale

La queue C-terminale du CFTR s'étalerait des résidus 1383 à 1480. Cette extrémité présente un motif ¹⁴⁷⁷DTRL¹⁴⁸⁰ lui permettant d'être reconnue par de multiples protéines à domaine PDZ. Ces diverses interactions sont décrites pour moduler le transport intracellulaire du CFTR (compartiment post-golgien), sa stabilité dans la membrane plasmique ainsi que son activité.

3.2.6. Structure quaternaire de la protéine CFTR

L'élucidation de la structure quaternaire de la protéine CFTR a fait, et continue de faire l'objet de nombreux travaux. L'état oligomérique de la protéine CFTR reste très discuté. Les différentes approches biochimiques, électrophysiologiques et de microscopie menées à ce jour rapportent l'existence de différents états d'oligomérisation pour la protéine CFTR insérée dans les membranes plasmiques. Les deux principales organisations décrites sont : l'état dimérique (Zerhusen *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2000b, Ramjeesingh *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2004, Schillers *et al.*, 2004, Mio *et al.*, 2008) et l'état monomérique (Marshall *et al.*, 1994, Chen *et al.*, 2002, Rosenberg *et al.*, 2004).

Contrairement à la majorité des études citées précédemment, le groupe de A.S. Verkman s'est penché sur l'état oligomérique de la protéine CFTR dans la membrane plasmique des cellules vivantes. L'utilisation de la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF, *total internal reflexion fluorescence microscopy*) s'est révélée idéale pour l'étude de fluorescence à une seule

molécule, des interfaces et membranes (*single molecule fluorescence imaging*). L'analyse de l'intensité des spots et du « *photobleaching* » apporte de solides preuves quant à la structure monomérique du CFTR dans la membrane plasmique des cellules vivantes. Sous cette forme, un polypeptide CFTR seul serait suffisant et fonctionnel pour un transport efficace des ions Cl⁻ et bicarbonates (HCO₃⁻) (Haggie et Verkman, 2008).

3.2.7. Modélisation tridimensionnelle de la protéine CFTR

Des structures de haute résolution pour la protéine CFTR entière ne sont actuellement pas disponibles. Du fait de sa grande taille [~170 kilodalton (kDa)], l'obtention de tels modèles par l'utilisation des techniques de modélisation moléculaire expérimentale classiques s'avère difficile. Les techniques d'alignement de séquences et de modélisation comparative ont été, et continuent donc d'être largement utilisées pour la détermination de sa structure 3D.

Dans un premier temps, les techniques d'alignement de séquences et de cristallographie ont permis de proposer différents modèles pour NBD1 et l'hétérodimère NBD1/NBD2 (Lewis *et al.*, 2004, Lewis *et al.*, 2005, Callebaut *et al.*, 2004). La même année, une étude de cristallographie a soumis un modèle basse résolution de la protéine CFTR entière (Rosenberg *et al.*, 2004). La détermination de la structure complète du transporteur ABC bactérien Sav1866 (Dawson et Locher, 2007) a conduit à la proposition de deux modèles de la protéine CFTR entière (Mornon *et al.*, 2008, Serohijos *et al.*, 2008). Ces modèles présentent la protéine en configuration dite « *outward-facing* » (position ouverte), avec la présence de l'hétérodimère NBD1/NBD2 (**Figures 9.B et 13.A**). Enfin, l'utilisation de structures corrigées de transporteurs MsbA, en absence d'ATP, a permis de suggérer un modèle pour le canal CFTR en configuration « *inward-facing* » (position fermée), avec la présence des NBDs sous forme monomérique non liés à l'ATP (Mornon *et al.*, 2009).

L'obtention de tels modèles est essentielle. La vue en 3D de la protéine CFTR entière permettra d'apporter de nombreux renseignements, notamment sur les différentes interactions interdomaines mises en place et les conséquences engendrées par des modifications d'acides aminés sur l'activité du canal. Ces modélisations fourniront également de précieuses informations sur le mode d'action des molécules correctrices et potentiatrices (sites possibles d'interaction avec la protéine CFTR).

4. Le CFTR, une protéine multifonctionnelle

Dès l'identification de sa structure primaire, il fut établi que le CFTR pouvait être le canal chlorure défectueux responsable de la mucoviscidose ou un régulateur de conductances ioniques (Riordan *et al.*, 1989). Bien que de nombreux travaux rapportent l'influence du CFTR sur l'activité de plusieurs canaux ioniques et autres transporteurs, des preuves expérimentales solides indiquent que le canal CFTR présente une conductance anionique épithéliale qui lui est propre.

4.1. Le CFTR : un canal ionique aux perméabilités nombreuses

4.1.1. Propriétés et modalités d'activation et de désactivation du canal

a. Propriétés du canal

Diverses approches électrophysiologiques mises en place au début des années 1990 ont établi un lien entre l'expression d'une protéine CFTR fonctionnelle à la membrane plasmique et la sécrétion d'ions Cl^- dépendante de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) à travers les épithélia (Drumm *et al.*, 1990, Rich *et al.*, 1990). De plus, elles ont également permis de s'assurer que la sécrétion Cl^- était bien médiée par la protéine CFTR elle-même (Rommens *et al.*, 1991, Bear *et al.*, 1991, Bear *et al.*, 1992).

Parallèlement à cela, d'autres expérimentations ont apporté des informations essentielles sur les propriétés du canal et sur ses modalités d'ouverture et de fermeture. Le CFTR présente une sélectivité plus grande pour les anions que pour les cations. Cette sélectivité anionique s'explique par la présence de certains acides aminés dans les segments transmembranaires participant à la formation du pore (Anderson *et al.*, 1991b, Bear *et al.*, 1992, Tabcharani *et al.*, 1997, voir § 3.2.1). Il est caractérisé par une faible conductance, comprise entre 6 et 10 pS en fonction des conditions expérimentales mises en place (type cellulaire, concentration en ions, température) (Anderson *et al.*, 1991b, Bear *et al.*, 1992, pour revue : Sheppard et Welsh, 1999). Le CFTR est perméable aux ions Cl^- mais également à d'autres ions halogénures tels que les ions iodure (I^-), bromure (Br^-) et fluorure (F^-), avec la séquence de perméabilité suivante : $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ (Anderson *et al.*, 1991b). Cette dernière est principalement influencée par l'énergie d'hydratation des anions (Smith *et al.*, 1999, pour revue : Bormann *et al.*, 1987). Cette séquence distingue le CFTR des autres canaux chlorure épithéliaux, comme le canal ORCC, qui présente une perméabilité aux ions I^- supérieure à celle observée pour les ions Cl^- (pour revue : Sheppard et Welsh, 1999).

Ces différentes études ont aussi permis de préciser que l'activation du canal CFTR est modulée par des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation de son domaine R (Tabcharani *et al.*, 1991). Par ailleurs, la liaison de molécules d'ATP sur les NBDs s'avère essentielle pour l'ouverture de ce canal chlorure (Anderson *et al.*, 1991a).

b. De la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP dépend l'ouverture et la fermeture du canal CFTR (« gating of CFTR »)

Déjà unique au sein des transporteurs ABC, ce canal présente une autre remarquable distinction. Contrairement aux canaux ioniques classiques à ouverture dépendante d'un ligand (par exemple le récepteur nicotinique de l'acétylcholine), le CFTR est le seul à consommer son ligand, en l'occurrence l'ATP, pendant son cycle d'ouverture/fermeture. Ce phénomène unique s'explique par l'évolution de ce transporteur ABC en un canal ionique (pour revues : Gadsby *et al.*, 2006, Chen et Hwang, 2008).

• Importance du site II dans l'ouverture et la fermeture du canal CFTR

L'ouverture du canal CFTR requiert la phosphorylation préalable de son domaine R par des protéines kinases. Ce prérequis établi, l'ATP va pouvoir aller se fixer sur les motifs Walker A et B de

chacun des NBDs, favorisant leur dimérisation dans une configuration tête-bêche (Vergani *et al.*, 2005). Les molécules d'ATP se retrouvent ainsi coincées entre les motifs Walker A et B de l'un des NBDs et le motif C du NBD partenaire, qui constituent les sites dits « composites » I et II localisés à l'interface du dimère [voir § 3.2.3 (**Figure 12**)].

Le magnésium (Mg^{2+}) représente un cofacteur essentiel, qui se doit d'être associé à l'ATP pour une ouverture optimale du CFTR (Dousmanis *et al.*, 2002). L'interaction du Mg^{2+} avec le résidu aspartate du motif Walker B aide à la liaison de l'ATP sur les NBDs. De plus, il s'avère essentiel pour l'hydrolyse du nucléotide, engagée dans la fermeture du canal (Hwang *et al.*, 1994, Ramjeesingh *et al.*, 1999, Vergani *et al.*, 2005, pour revue : Hwang et Kirk, 2013).

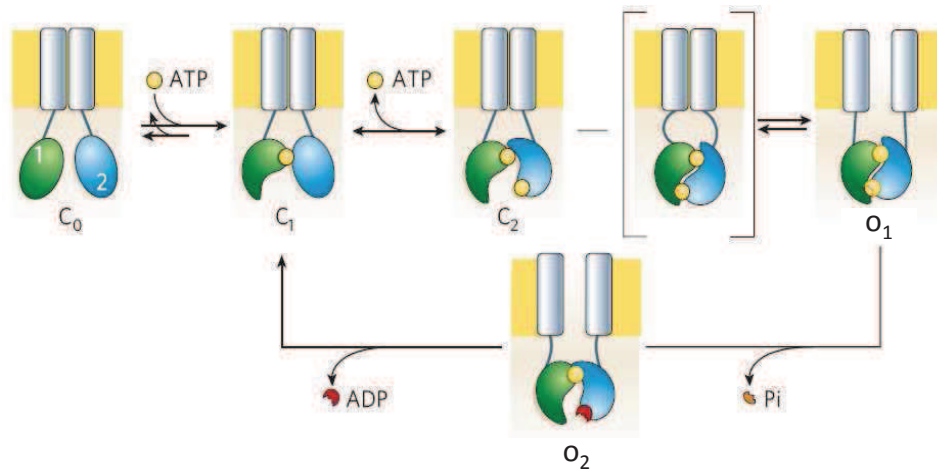
La majorité des études s'accorde sur le fait que la dimérisation des NBDs entraîne des changements conformationnels des domaines transmembranaires, responsables de l'ouverture du canal. Toutefois, le mécanisme de couplage n'est, à l'heure actuelle, pas encore clarifié et reste discuté. L'interaction de l'ATP avec le site de liaison II semble primordiale pour l'ouverture du canal (Zhou *et al.*, 2006) et plusieurs études démontrent le rôle crucial du motif LSGGQ du NBD1. La mise en place d'un pont hydrogène entre certains résidus de ce motif, notamment la glycine G551, et le groupement γ -phosphate de l'ATP serait impliquée dans la transmission d'un signal nécessaire à l'ouverture de la « porte » du canal (Bompadre *et al.*, 2007, Bompadre *et al.*, 2008, pour revue : Hwang et Sheppard, 2009).

De nombreuses données expérimentales témoignent de la corrélation entre l'hydrolyse de l'ATP et la fermeture du canal. Des analogues non hydrolysables de l'ATP, tels que l'AMP-PNP (*adenylyl imidodiphosphate*) ou le pyrophosphate (PPi), bloquent le canal CFTR dans un état ouvert stable (Gunderson et Kopito 1994, Hwang *et al.*, 1994, Carson *et al.*, 1995). Ce blocage en configuration ouverte est également observé lorsque des mutations sont opérées au niveau de deux résidus essentiels pour une hydrolyse efficace de l'ATP, à savoir les résidus K1250 et E1371 (Gunderson et Kopito, 1995, Ramjeesingh *et al.*, 1999, Zeltwanger *et al.*, 1999, Bompadre *et al.*, 2005b, Vergani *et al.*, 2005, Stratford *et al.*, 2007). Déjà mentionné précédemment, le site I présente une activité catalytique négligeable en comparaison avec celle décrite pour le site II [Aleksandrov *et al.*, 2002, voir § 3.2.3 (**Figure 12.A**)]. Ainsi, il est maintenant clairement établi que l'hydrolyse de l'ATP au niveau du site II est responsable de la dissociation de l'hétérodimère NBD1/NBD2 et donc de la fermeture du canal (pour revues : Gadsby *et al.*, 2006, Chen et Hwang, 2008).

- Modèles proposés pour le cycle d'ouverture/fermeture du canal CFTR

D'après les différentes données accumulées à ce jour, chaque cycle (ouverture/fermeture) du canal CFTR, d'une durée d'environ 1 seconde (Li *et al.*, 1996), pourrait être modélisé de la manière suivante : i) phosphorylation du domaine R, menant à des changements conformationnels favorisant la liaison de l'ATP sur les NBDs, ii) fixation de l'ATP sur les sites de liaison des NBDs, conduisant à leur dimérisation, laquelle s'accompagne d'un changement de conformation des TMDs responsable de l'ouverture de la « porte » externe du canal et du passage des ions Cl^- ($\sim 10^6$ /cycle), et iii) hydrolyse de l'ATP au niveau du site « composite » II, entraînant la dissociation de l'hétérodimère et la fermeture du canal (Vergani *et al.*, 2005, pour revue : Muallem et Vergani, 2009) (**Figure 15.A**).

A.



B.

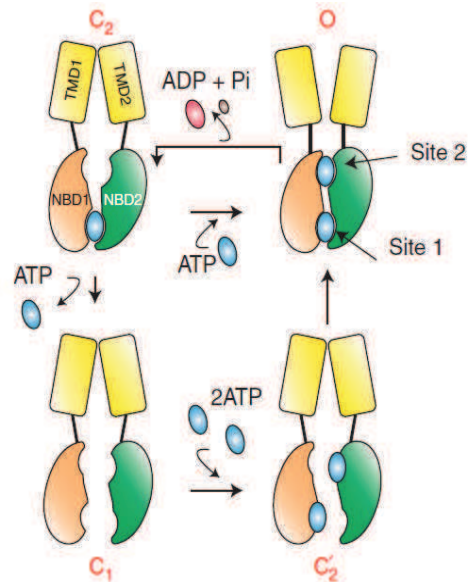


Figure 15 (A-B) : Modèles proposés pour le cycle d'ouverture/fermeture du canal CFTR

A. Modèle proposé par Vergani et collaborateurs en 2005, lequel présente un état fermé du canal sans une dissociation complète de l'hétérodimère. NBD1 et NBD2 apparaissent respectivement en vert et en bleu. **B.** Modèle proposé par Tsai et collaborateurs en 2010 reposant sur une mobilité limitée des NBDs au cours des cycles d'ouverture/fermeture. Selon ce modèle, le passage de l'état O à C2 (et C2 à O) serait la transition dominante, reposant sur un désassemblage partiel des NBDs, avec le site 1 occupé par une molécule d'ATP stablement liée. La transition $C_1 \rightarrow C_2' \rightarrow O \rightarrow C_2 \rightarrow C_1$ a également été proposée, cette dernière se concluant par la dissociation complète du dimère NBD1/NBD2.

ADP : adénosine diphosphate, ATP : adénosine triphosphate, C : état fermé du canal (*closed*), CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), O : état ouvert du canal (*open*), Pi : phosphate inorganique, TMD1 et TMD2 : domaines transmembranaires (TMDs, *transmembrane domains*)

A. d'après la revue de Gadsby et al., 2006, B. d'après la revue de Hwang et Sheppard, 2013

La fermeture du canal peut se développer sans une séparation complète de l'hétérodimère NBD1/NBD2, comme illustré sur la **Figure 15.A** (pour revue : Kirk et Wang, 2011). En cohérence avec ce concept, Tsai et collaborateurs proposent en 2010 un nouveau modèle reposant sur une mobilité limitée des NBDs. Suite à l'hydrolyse de l'ATP au niveau du site II, la fermeture du canal serait plus généralement associée à un état partiellement dimérisé des NBDs. Pendant que plusieurs cycles liaison/hydrolyse de l'ATP sont observés au niveau du site II, entraînant ouverture et fermeture du canal CFTR, le site I reste quant à lui occupé par une molécule d'ATP stablement liée. Cependant, cette molécule d'ATP pourra occasionnellement se dissocier de son site de liaison, entraînant une dimérisation totale des NBDs. Selon les auteurs, en fonction de l'état d'organisation des NBDs [monomères ou dimère partiel (site non-canonique occupé par une molécule d'ATP)], la transition vers la configuration ouverte du canal CFTR se ferait par différentes voies. Deux cycles distincts d'ouverture/fermeture ont ainsi été proposés (Tsai *et al.*, 2010) (**Figure 15.B**).

Le canal CFTR serait également capable de mettre en place des cycles d'ouverture/fermeture de manière indépendante de l'ATP, avec toutefois une cinétique une plus lente (Bompadre *et al.*, 2005a, Bompadre *et al.*, 2007, Cui *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2007a). Ce mécanisme moléculaire, non conventionnel, a d'ailleurs été avancé récemment pour expliquer le mode d'action du potentiateur VX-770 (Eckford *et al.*, 2012, Jih et Hwang, 2013).

Bien que des progrès considérables aient été effectués, l'obtention de structures de haute résolution pour la protéine CFTR entière s'avère essentielle pour une compréhension complète des mécanismes d'ouverture et de fermeture de ce canal (pour revue : Hwang et Kirk, 2013).

c. Le processus de phosphorylation du canal CFTR

La phosphorylation du domaine R par les protéines kinases est un prérequis essentiel pour l'ouverture du canal en présence de MgATP (Li *et al.*, 1996, pour revues : Gadsby et Nairn 1999a, Ostegaard *et al.*, 2001).

• Implication de la protéine kinase A

Les effets de la phosphorylation par la protéine kinase dépendante de l'AMPc sur l'activation du canal CFTR sont très certainement les mieux caractérisés. De nombreuses séquences consensus potentiellement phosphorylables par la PKA ont été décrites (15 au total), la majorité étant répartie tout le long du domaine R [Riordan *et al.*, 1989, pour revue : Seibert *et al.*, 1999, voir § 3.2.4 (**Figure 14**)].

S'il est bien établi que l'ouverture du canal est fortement inhibée en présence d'un domaine R non phosphorylé, les conséquences moléculaires engendrées par la phosphorylation et favorisant l'ouverture du canal ne sont pas claires. L'addition de charges négatives apportées par les groupes phosphorylés ainsi que des changements conformationnels du domaine font partie des hypothèses les plus souvent avancées (Rich *et al.*, 1993). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la régulation de l'ouverture du CFTR par la phosphorylation par la PKA. Trois mécanismes sont à considérer, lesquels sont résumés dans le **Tableau II**.

Tableau II : Mécanismes de régulation de l'ouverture du canal CFTR par la PKA

Mécanismes	Description	Références
I	la phosphorylation du domaine R par la PKA module la dimérisation des NBDs : ◦interactions dynamiques entre le domaine R et NBD1 ◦la phosphorylation par la PKA du domaine R promeut la dissociation entre ce dernier et NBD1 ⇒ liant NBD1, le domaine R non phosphorylé inhibe l'activité canal chlorure du CFTR en empêchant la dimérisation des NBDs, responsable de l'ouverture du canal	Mense <i>et al.</i>, 2006 Baker <i>et al.</i>, 2007
II	la phosphorylation du domaine R par la PKA affecte l'ouverture du canal indépendamment de la dimérisation des NBDs : ◦l'interaction physique entre le domaine R phosphorylé et les segments TMs et/ou leurs ICLs conduirait à un réarrangement conformationnel des TMDs favorable à l'ouverture du canal	Cui <i>et al.</i>, 2007 Wang <i>et al.</i>, 2007 Wang <i>et al.</i>, 2010b Bompadre <i>et al.</i>, 2007 Hegedus <i>et al.</i>, 2008 Zhang <i>et al.</i>, 2010
III	la phosphorylation du NBD1 par la PKA stabiliserait le couplage entre les NBDs et les TMDs : ◦les interactions dynamiques entre NBD1 et TMD1 seraient régulées par la phosphorylation du NBD1 ⇒ un tel mécanisme pourrait s'opérer en parallèle avec la phosphorylation du domaine R, potentialisant l'activation du CFTR par la PKA	Kanelis <i>et al.</i>, 2009

CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* , domaine R : domaine régulateur

ICLs : boucles intracytoplasmiques (*intra-cellular loops*), NBDs : domaines de liaison aux nucléotides (*nucleotide binding domains*)

PKA : protéine kinase A, TMDs : domaines transmembranaires (*transmembrane domains*), TMs : transmembranaires

d'après la revue de Hwang et Kirk, 2013

La phosphorylation par la PKA peut ainsi impacter le processus d'ouverture/fermeture du canal de multiples façons. Ces différentes études soulignent également l'importance des interactions interdomaines pour un fonctionnement optimal du CFTR. Déjà en 1999, Naren et collaborateurs révélaient que l'extrémité N-terminale contrôlait l'ouverture du canal CFTR par l'intermédiaire d'une interaction physique avec le domaine R (Naren *et al.*, 1999). Depuis, le nombre croissant d'études de modélisation 3D de la protéine CFTR n'a fait que confirmer ces observations et fourni des informations précieuses sur le rôle crucial de certaines interfaces NBD/ICL pour une transmission efficace du signal des NBDs aux TMDs (Serohijos *et al.*, 2008, He *et al.*, 2008, Mornon *et al.*, 2008). Ces travaux ont également mis en exergue l'importance du résidu F508 (localisé à la surface du NBD1) dans la communication orthogonale entre NBD1 et TMD2, via l'ICL4.

- Implication d'autres protéines kinases

A côté de la voie AMPc/PKA, d'autres kinases sont également impliquées dans l'activité du canal CFTR. C'est le cas de la PKC, de la protéine kinase dépendante du Ca^{2+} et de la calmoduline (CaMK, *Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase*), de la protéine kinase II dépendante du GMPc (guanosine monophosphate cyclique) ou PKG, de la protéine kinase CK2 (*caseine kinase 2*) et de l'AMPK. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en place ne sont pas encore bien compris. Ne seront discutées ici que quelques études relatives à la PKC, la CK2 et l'AMPK.

Certains résidus du domaine R potentiellement phosphorylables par la PKA sont également reconnus par la **PKC** (Picciotto *et al.*, 1992, Jia *et al.*, 1997, Chappe *et al.*, 2003). Néanmoins, le domaine R présente aussi des sites de phosphorylation propres à la PKC. Cette kinase est capable de stimuler seule le CFTR, mais un concept accepté depuis longtemps est qu'elle améliore l'activation du canal CFTR par la PKA. Des changements conformationnels du domaine R suite à sa phosphorylation par la PKC faciliteraient l'action de la PKA (Jia *et al.*, 1997, Chappe *et al.*, 2003, Chappe *et al.*, 2004).

La protéine kinase **CK2** est une protéine hétérotétramérique composée de deux sous-unités catalytiques α (47 kDa) et de deux sous-unités régulatrices β (26 kDa). Elle est engagée dans le contrôle de nombreux processus biologiques tels que le transport protéique, la prolifération cellulaire (inhibition de l'apoptose) et le développement.

Cette kinase posséderait également un rôle majeur dans la régulation de l'activité du canal CFTR. La CK2 est capable de lier la protéine CFTR aux abords du résidu F508 et de phosphoryler la sérine S511 (*in vitro* et *in vivo*), impactant positivement les courants Cl^- AMPc-dépendants. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la CK2, le TBB (tétrabromobenzotriazole), tout comme la mutation de la sérine S511, perturbent fortement le processus d'ouverture/fermeture du CFTR. Selon les auteurs, l'activité CK2 serait requise pour que le canal CFTR demeure en configuration ouverte suite à la stimulation par la PKA (Treharne *et al.*, 2007, Treharne *et al.*, 2009). L'interaction entre NBD1 et la CK2 est sélectivement abolie par la mutation F508del, expliquant l'insensibilité des cellules exprimant le mutant CFTR-F508del face à l'inhibition de la CK2 (Treharne *et al.*, 2007, Treharne *et al.*, 2009). Une étude menée à partir de tissus natifs (côlon et trachée de souris) confirme le rôle crucial de la CK2 dans le transport transépithélial des électrolytes, médié par le canal CFTR (Luz *et al.*, 2011). Ces

travaux révèlent aussi l'importance de deux autres sites phosphorylables par la CK2, la sérine S422 et la thréonine T1471. Alors que la phosphorylation de la S422 contribuerait à l'activation du canal, celle de la T1471 influencerait le transport du CFTR à la membrane (Luz *et al.*, 2011).

L'**AMPK** est un senseur métabolique essentiel pour la cellule. Elle se présente sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ .

Des expériences de double-hybride ont révélé une interaction entre l'isoforme 1 de la sous-unité catalytique α de l'AMPK (AMPK α 1) et l'extrémité C-terminale de la protéine CFTR (résidus 1420-1457). Ces mêmes travaux rapportent également : i) une phosphorylation (*in vitro*) du CFTR entier par l'AMPK α 1, ii) une colocalisation de ces deux protéines à la membrane apicale de cellules épithéliales nasales de rat et iii) une inhibition (~ 35-50 %) de la conductance chlorure (conductance Cl⁻) AMPc-dépendante, lorsque les deux protagonistes sont exprimés dans des ovocytes de Xénope (Hallows *et al.*, 2000).

La phosphorylation du CFTR par l'AMPK affecte son processus d'ouverture/fermeture mais n'impacte pas son niveau d'expression dans la membrane plasmique. Ce senseur métabolique jouerait un rôle essentiel, en ajustant l'activité du canal CFTR en fonction de la charge énergétique cellulaire. L'activité régulatrice de l'AMPK permettrait ainsi de coupler le transport ionique transépithélial à l'état métabolique de la cellule (Hallows *et al.*, 2003a,b, pour revue : Hallows, 2005).

Des études entreprises pour caractériser les mécanismes de régulation du CFTR par l'AMPK confirment sa phosphorylation *in vivo* (S768). Par ailleurs, l'AMPK n'altère pas la phosphorylation du canal par les kinases A et C, mais semble plutôt rendre le CFTR insensible à la stimulation par la PKA, inhibant ainsi l'ouverture du canal (King *et al.*, 2009).

La NDPK (*nucleoside diphosphate kinase*), identifiée comme partenaire du CFTR (Crawford *et al.*, 2006), est capable d'interagir physiquement et fonctionnellement avec l'AMPK α 1 (Crawford *et al.*, 2005, Crawford *et al.*, 2006, pour revue : Muimo *et al.*, 2006). Des travaux récents rapportent l'existence d'un complexe cellulaire fonctionnel apical composé du CFTR, de l'AMPK et de l'isoforme NDPK-A. La phosphorylation de cette dernière sur son histidine catalytique (H118) serait requise pour permettre à l'AMPK d'exercer son action inhibitrice sur le canal CFTR (King *et al.*, 2012).

d. Désactivation du CFTR par les phosphatases et le rôle joué par les seconds messagers

- Régulation par les protéines phosphatases

L'ouverture du canal CFTR est modulée par l'équilibre entre l'activité kinase et phosphatase. Lorsque le transport transépithélial des électrolytes n'est pas nécessaire, l'activité des protéines phosphatases maintient le canal CFTR dans un état déphosphorylé et inactif (Becq *et al.*, 1994). La désactivation du canal par les phosphatases est bien moins documentée que le contrôle de l'activation du CFTR par les protéines kinases. PP2A et PP2C semblent être les deux phosphatases principalement engagées dans la désactivation rapide du canal CFTR (Berger *et al.*, 1993, Luo *et al.*, 1998). Certaines phosphatases présentent des motifs d'ancrage à la membrane, favorisant leur colocalisation avec la protéine CFTR au niveau apical. Ce rapprochement spatial permet d'expliquer la

rapidité d'action de ces enzymes (Becq *et al.*, 1993). Par ailleurs, des études rapportent une interaction physique entre le CFTR et les protéines PP2A et PP2C (Zhu *et al.*, 1999, Thelin *et al.*, 2005, Vastiau *et al.*, 2005). PP2A serait capable de lier l'extrémité C-terminale du CFTR (Thelin *et al.*, 2005) ainsi que son domaine R (Vastiau *et al.*, 2005).

- Régulation par les seconds messagers

L'activation de la PKA est contrôlée par l'AMPc, dont la concentration intracellulaire repose sur l'équilibre entre sa synthèse par l'adénylate cyclase (AC) et sa dégradation par les phosphodiésterases (PDEs). Toute baisse importante des taux d'AMPc intracellulaires perturbera l'action de la PKA et impactera, de ce fait, l'activation du canal CFTR. Ceci explique l'utilisation de molécules telles que la forskoline (activateur de l'AC) ou encore de xanthines comme l'IBMX (*3-isobutyl-1-methylxanthine*) (inhibiteur des PDEs) lors des mesures d'activité *in vitro* de la protéine CFTR.

Une ouverture optimale du canal CFTR repose, entre autres, sur une compartimentation sous-membranaire de l'AMPc. Cette configuration va permettre d'activer efficacement la PKA, laquelle est localisée au sein de complexes de signalisation macromoléculaires regroupant le CFTR, NHERF1, l'ezrine et l'actine (pour revue : Li et Naren, 2010).

4.1.2. Autres types de perméabilité

a. Perméabilité aux anions polyatomiques

En plus d'être perméable à de nombreux ions monovalents, le canal CFTR présente également une perméabilité à divers anions polyatomiques. Très tôt, des études ont pu mettre en évidence le défaut de sécrétion des ions HCO_3^- dans le pancréas de patients atteints de mucoviscidose et l'acidification des fluides recouvrant la surface épithéliale d'autres organes et tissus (Johansen *et al.*, 1968, Kopelman *et al.*, 1988). Plus tard, des travaux ont révélé le transport de cet ion par le canal CFTR lui-même, dans les épithélia du tractus digestif (Gray *et al.*, 1990) et des voies aériennes (Devor *et al.*, 1999, Coakley *et al.*, 2003). Les ions HCO_3^- apparaissent être, avec les ions Cl^- , les deux principaux anions transportés par le canal CFTR au niveau physiologique (pour revue : Riordan, 2008). Un autre exemple est la perméabilité aux ions thiocyanates (SCN^-). Leur transport à la surface de l'épithélium bronchique permet la génération d'hypothiocyanite, qui participe à l'élimination des agents pathogènes *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Moskwa *et al.*, 2007).

Les travaux menés par le groupe de J.W. Hanrahan ont permis d'établir la séquence de perméabilité suivante : nitrate (NO_3^-) > Cl^- > HCO_3^- > formate (HCO_2^-) > acétate (CH_3CO_2^-) (Linsdell *et al.*, 1997). Les ions SCN^- n'apparaissent pas ici, mais seraient placés en amont des ions NO_3^- (pour revue : Hwang et Kirk, 2013). Le canal CFTR n'est toutefois pas perméable au pyruvate, propanoate, gluconate, méthanesulfonate et à l'éthanesulfonate (Linsdell *et al.*, 1997).

b. Perméabilité au glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide possédant un fort pouvoir antioxydant, protégeant les cellules du stress oxydatif causé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygene*

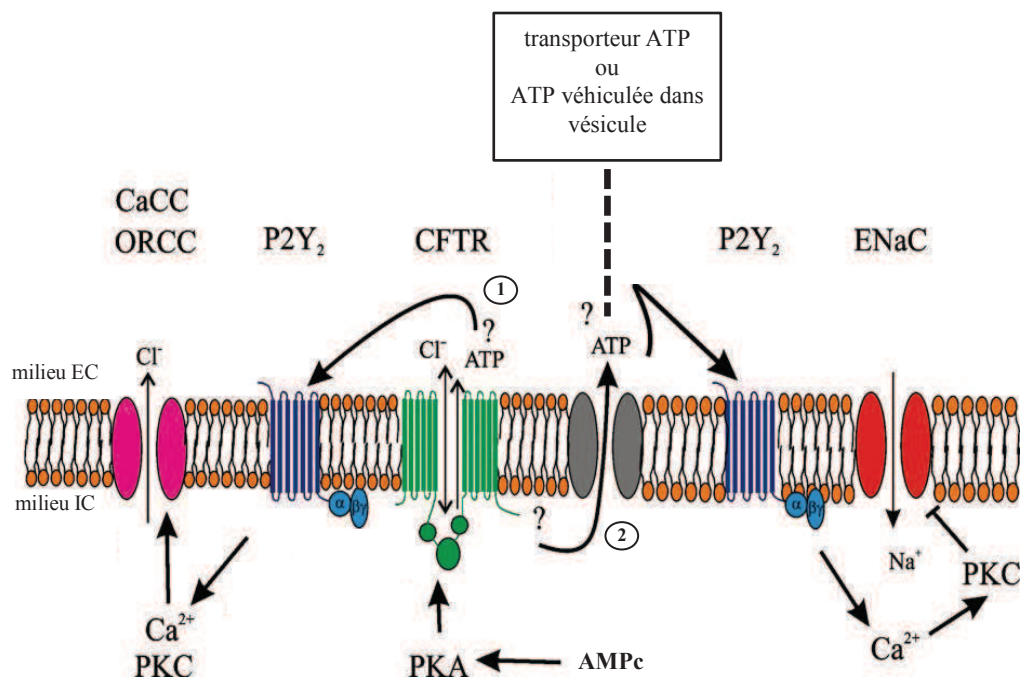


Figure 16 : La libération CFTR-dépendante de l'ATP impliquée dans la régulation de canaux ioniques

Deux modèles décrivent la libération d'ATP dans le milieu EC à la surface des épithélia : directement par le canal CFTR (①) ou indirectement via un transporteur distinct ou par la régulation du trafic de vésicules véhiculant l'ATP (②).

AMPc : adénosine monophosphate cyclique, ATP : adénosine triphosphate, CaCC : *Ca²⁺-activated chloride channel*, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, Ca²⁺ : ion calcium, Cl⁻ : ion chlorure, EC : extracellulaire, ENaC : *epithelial sodium channel*, IC : intracellulaire, Na⁺ : ion sodium, P2Y₂ : récepteur purinergique, PKA/PKC : protéine kinase A et C, ORCC : *outwardly rectifying chloride channel*

adapté de la revue de Marcet et Boeynaems, 2006

species). Il est retrouvé en très grande quantité dans le liquide de surface pulmonaire, où il représente l'antioxydant extracellulaire majeur. Le canal CFTR semble directement impliqué dans le transport apical du GSH. Il serait d'ailleurs le seul transporteur perméable à ce tripeptide dans les poumons (Linsdell et Hanrahan, 1998, Kogan *et al.*, 2003). Au vu des rôles essentiels assurés par ce peptide, la perturbation de son homéostasie va fortement influencer l'atteinte pulmonaire. Des répercussions au niveau de la réponse immunitaire et des propriétés rhéologiques du mucus pourront conduire à l'aggravation des phénomènes inflammatoires (Childers *et al.*, 2007, pour revue : Hudson, 2001).

4.1.3. Le CFTR et le transport d'ATP

Très rapidement après la caractérisation de sa fonction de canal ionique, son implication dans les mécanismes de sécrétion de l'ATP à la surface des épithélia a été suggérée. Bien que de nombreuses études fassent état d'un lien entre l'activation du CFTR et le transport d'ATP, les résultats avancés restent pour le moins discutés. La libération de l'ATP dans le milieu extracellulaire se fait-elle directement à travers le canal CFTR lui-même ou de manière indirecte via un mécanisme contrôlé par le CFTR (pour revue : Schwiebert, 1999) ?

Alors que Reisin et collaborateurs montrent clairement la perméabilité du CFTR à l'ATP (Reisin *et al.*, 1994), d'autres travaux prouvent que les transports d'ions Cl^- et d'ATP se font par deux canaux distincts et que la régulation du flux d'ATP par le CFTR serait indirecte (Li *et al.*, 1996, Reddy *et al.*, 1996). Un argument en faveur de la non-perméabilité du CFTR à l'ATP est que la taille de ce nucléotide (~ 10 angströms) est supérieure au diamètre minimal du pore du canal CFTR (~ 5.3 angströms) (Linsdell *et al.*, 1997, pour revue : Marcet et Boeynaems, 2006).

L'hypothèse la plus vraisemblable, et sur laquelle s'accordent différents auteurs, serait que la protéine CFTR régule l'activité d'un canal transportant l'ATP de manière spécifique (Sugita *et al.*, 1998, pour revue : Marcet et Boeynaems, 2006). Cette fonction du CFTR s'avère essentielle pour le maintien de l'homéostasie des fluides recouvrant les surfaces épithéliales. En effet, l'ATP présent dans le milieu extracellulaire va pouvoir interagir avec les récepteurs purinergiques P2Y_2 , activant les voies de signalisation qui lui sont associées (**Figure 16**). L'ATP participerait ainsi à la régulation de certains canaux présents à la surface des cellules épithéliales tels que les canaux ORCC et ENaC (pour revue : Marcet et Boeynaems, 2006).

4.2. Le CFTR : une protéine régulatrice de canaux ioniques et transporteurs

Avant même que sa conductance ionique propre n'ait été reconnue, le CFTR avait déjà été décrit comme protéine régulatrice de l'activité d'une grande variété de canaux ioniques et transporteurs. L'hypothèse d'une fonction régulatrice a été émise au regard du nombre important de dysfonctionnements observés dans les épithélia des patients atteints de mucoviscidose. Peuvent être citées, la conductance ionique altérée d'autres canaux chlorure, comme le canal ORCC, ou encore l'hyperabsorption des ions Na^+ par le canal ENaC. Ces observations sont d'ailleurs à l'origine de la dénomination de cette protéine, CFTR pour : « *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* » ou régulateur de conductances membranaires.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ces diverses régulations. Il reste cependant de nombreux points à éclaircir. Ce contrôle s'explique-t-il par la présence du polypeptide CFTR lui-même ou dépend-il de la conductance anionique qu'il médie ? Comment un seul canal ionique peut moduler l'activité de tant d'autres protéines ? La formation de complexes macromoléculaires apicaux assurée par des protéines à domaine PDZ est une des hypothèses avancées pour répondre à cette question. Ces protéines d'échafaudage permettraient l'instauration d'un dialogue entre la protéine CFTR et diverses voies de transport ionique transépithélial apical (pour revue : Li et Naren, 2010).

4.2.1. Le CFTR et les canaux chlorure (TMEM16A/F)

a. CFTR et ORCCs (TMEM16F, transmembrane protein 16F)

Le canal chlorure rectifiant sortant, localisé dans la membrane apicale (et basolatérale) des cellules épithéliales, participe à la sécrétion des ions Cl^- et présente une régulation par l'AMPc. Considérant ses propriétés, il fut un temps suspecté d'être la protéine déficiente dans la mucoviscidose (Frizzell *et al.*, 1986, Welsh, 1986). Très rapidement après le clonage du gène, il a été établi que le CFTR était impliqué dans la conductance membranaire des canaux ORCC (Egan *et al.*, 1992). La présence apicale d'une protéine CFTR fonctionnelle serait requise pour une pleine activité des ORCCs (Gabriel *et al.*, 1993, Jovov *et al.*, 1995). Plusieurs mécanismes de régulation ont été proposés, et notamment un mécanisme autocrine/paracrine impliquant l'efflux d'ATP dans le milieu extracellulaire [Schwiebert *et al.*, 1995, Hwang *et al.*, 1996, voir § 4.1.3 (**Figure 16**)]. Des études fonctionnelles (protéine CFTR tronquée) ont également permis de démontrer l'implication et la nécessité du NBD1 et du domaine R dans la régulation du canal ORCC (Schwiebert *et al.*, 1998).

b. CFTR et CaCCs (TMEM16A, transmembrane protein 16A)

L'appellation CaCC regroupe une famille de canaux chlorure activés par les ions Ca^{2+} , dont la nature (protéines et gènes) demeurerait jusqu'à très récemment encore inconnue. Ils sont retrouvés dans la membrane apicale des cellules épithéliales des voies respiratoires où, avec le CFTR, ils participent au transport transépithélial des électrolytes et de l'eau (Tarran *et al.*, 2002, pour revue : Hartzell *et al.*, 2005) (**Figure 1**). Ces canaux peuvent être activés directement par les ions Ca^{2+} , suite à l'activation (dépendante de l'ATP) de la voie de signalisation associée aux récepteurs P2Y_2 apicaux ou à l'influx d'ions Ca^{2+} via des canaux calciques présents à la surface des cellules [Orai1 (CRACM1, *calcium release-activated calcium modulator 1*), TRP (*transient receptor potentiel*)]. Les CaCCs peuvent également être activés indirectement, suite à leur phosphorylation par la kinase CaMKII (pour revue : Hartzell *et al.*, 2005).

L'identité moléculaire des CaCCs a été dévoilée récemment avec l'identification de la protéine TMEM16A, également connue sous le nom d'anoctamine-1 (ANO1) (Caputo *et al.*, 2008, Schroeder *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2008). Selon certaines données [siRNA (*small interfering RNA*) et modèle murin « knock-out » pour le gène *ANO1*], TMEM16A jouerait un rôle prédominant dans le transport Ca^{2+} -dépendant des ions Cl^- à travers l'épithélium des voies aériennes (Ousingsawat *et al.*, 2009).

Toutefois, du fait de son activation transitoire, la contribution de TMEM16A dans la sécrétion Cl⁻ apicale est moindre que celle assurée par le canal CFTR.

Longtemps considérées comme non fonctionnellement liées, les connaissances acquises récemment tendent à rapprocher les sécrétions Cl⁻ dépendantes de l'AMPc (CFTR) de celles dépendantes du calcium (TMEM16A). Le dialogue (« *crosstalk* ») entre ces deux voies de sécrétion Cl⁻ interviendrait à plusieurs niveaux : i) l'activation des récepteurs purinergiques, comme P2Y₂ et P2Y₆, conduit à l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc et en ions Ca²⁺, ii) l'activité des enzymes contrôlant les taux d'AMPc intracellulaires (AC, PDEs) est influencée par les ions Ca²⁺, iii) inversement, l'activité de certaines protéines impliquées dans le contrôle du Ca²⁺ intracellulaire, telles que la pompe SERCA [*serco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase*] et les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), est modulée par l'AMPc, iv) la concentration intracellulaire en ions Cl⁻ impacte le transport des ions Ca²⁺ à travers la membrane du RE et leur influx au niveau de la surface cellulaire (via Orai1 et TRP), v) les canaux CFTR et TMEM16A peuvent interagir de manière directe ou par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage (NHERF1), vi) le CFTR promeut l'adressage de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à la membrane plasmique (notamment liés à la sous-unité Gαq/11), conduisant à l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca²⁺ et à l'activation du canal TMEM16, et enfin vii) le messenger IRBIT (*IP3-receptor binding protein*), libéré suite à la liaison de l'IP3 sur son récepteur, pourrait interagir avec le CFTR apical et réguler son activité (pour revue : Kunzelmann *et al.*, 2012).

4.2.2. Le CFTR et le canal potassique ROMK

Les canaux ROMK (*renal outer medullary potassium*) appartiennent à la famille des canaux potassiques à rectification entrante. Ils sont principalement localisés dans la membrane apicale des cellules épithéliales rénales (Ho *et al.*, 1993, Lee et Hebert, 1995), où ils jouent un rôle essentiel dans le contrôle des transports transépithéliaux des électrolytes et de l'eau (Mennitt *et al.*, 1997). L'expression et l'activité de ces canaux peuvent être modulées par un certain nombre de facteurs tels que le pH intracellulaire, les niveaux d'ATP intra et extracellulaires ou encore la présence de molécules sulfonylurées comme le glibenclamide (pour revue : Hebert *et al.*, 2005).

La protéine CFTR est fortement exprimée dans le néphron. Son activité régulatrice sur les canaux ROMK a été suggérée dès 1996 (Morales *et al.*, 1996), sa présence étant requise pour la sensibilité des canaux ROMK au glibenclamide et à l'ATP (McNicholas *et al.*, 1996, Ruknudin *et al.*, 1998, Lu *et al.*, 2006). La relation fonctionnelle entre les canaux ROMK et CFTR serait basée sur la formation d'un complexe macromoléculaire apical impliquant les protéines NHERF1 et NHERF2 et les motifs PDZ présents sur les deux canaux (Yoo *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été montré que cette régulation n'était pas réciproque. En effet, l'absence des canaux ROMK n'altère pas la sécrétion Cl⁻ dépendante de la protéine CFTR (Lu *et al.*, 2010).

4.2.3. Le CFTR et le canal sodique ENaC

ENaC est un canal sodique propres aux cellules épithéliales. Localisé dans la membrane apicale, il assure l'absorption des ions Na^+ à travers de nombreux épithélia : tube collecteur du rein, tractus digestif et respiratoire (McDonald *et al.*, 1994, pour revue : Garty et Palmer, 1997). L'activité de ce canal sensible à l'amiloride est finement régulée, impliquant différents facteurs comme des hormones (aldostérone) ou l'ATP (Kunzelmann *et al.*, 2002, Ma *et al.*, 2002, pour revue : Garty et Palmer, 1997). Au niveau de l'épithélium de surface des voies respiratoires, son activité est également contrôlée par une balance protéases/inhibiteurs de protéases, présents dans l'ASL (Gentzsch *et al.*, 2010).

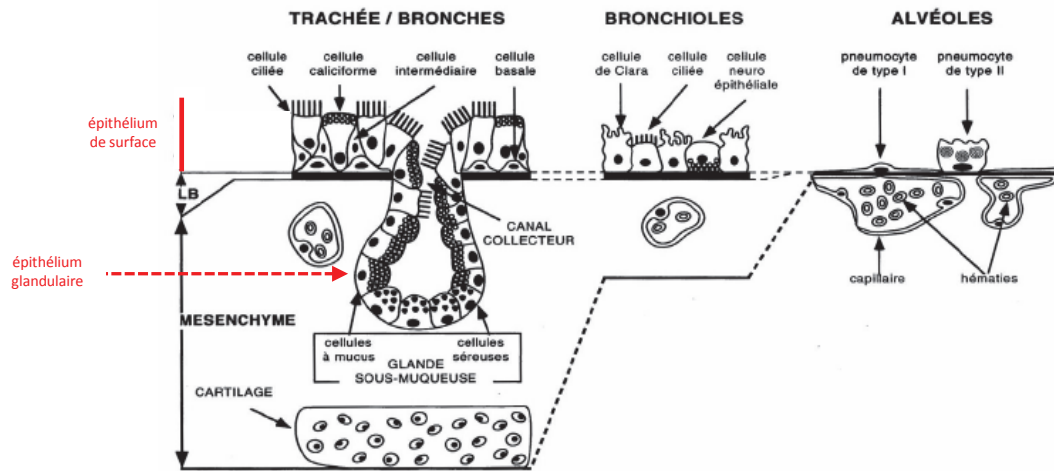
Dès 1995, des travaux font le lien entre le canal CFTR et ENaC, rapportant la régulation inhibitrice exercée par le CFTR sur le canal sodique (Stutts *et al.*, 1995). Observée dans différents modèles cellulaires (Mall *et al.*, 1996, Ling *et al.*, 1997, Briel *et al.*, 1998), la régulation de la conductance sodique, sensible à l'amiloride, par le CFTR est également décrite dans les épithélia respiratoire et colonique humains (Mall *et al.*, 1998, Mall *et al.*, 1999). La diminution des courants sodiques constatée dans les cellules épithéliales provenant de patients non-CF n'est en effet pas enregistrée dans les cellules provenant de patients CF (Mall *et al.*, 1998).

L'inhibition de l'activité du canal ENaC par le CFTR fait l'objet de nombreuses études. Néanmoins, le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) impliqué(s) reste(nt) discuté(s). Une régulation négative par l'ATP extracellulaire fait partie des hypothèses avancées [voir § 4.1.3 (**Figure 16**)]. La mise en place de la cascade de signalisation associée aux récepteurs P2Y_2 permet l'activation de la PKC, laquelle conduit à une diminution de l'expression membranaire des canaux ENaC (pour revue : Schwiebert *et al.*, 1999). Les flux d'ions Cl^- médiés par le CFTR et la concentration intracellulaire en ions Cl^- semblent également importants. L'inhibition du canal ENaC serait corrélée à l'amplitude des courants Cl^- (König *et al.*, 2001). Selon certains auteurs, la relation fonctionnelle entre le CFTR et ENaC impliquerait une interaction physique entre les deux canaux. Celle-ci pourrait être directe, et engager les domaines NBD1 et R du CFTR et les extrémités C-terminales des sous-unités α et β du canal ENaC (Kunzelmann *et al.*, 1997, Schreiber *et al.*, 1999a, Ji *et al.*, 2000), ou s'établir par l'intermédiaire d'éléments du cytosquelette tels que l'actine (pour revue : Schwiebert *et al.*, 1999).

Plus récemment, une étude a confirmé l'association physique entre ENaC et la forme sauvage du CFTR, laquelle protégerait ENaC de l'endoprotéolyse nécessaire à son activation (Gentzsch *et al.*, 2010). Enfin, l'implication de la protéine CFTR-wt dans la régulation de l'adressage à la membrane des canaux ENaC endogènes a aussi été suggérée. Cela permettrait d'expliquer l'expression fonctionnelle élevée des canaux ENaC dans les épithélia respiratoires CF (Rubenstein *et al.*, 2010).

Il est aujourd'hui défendu par de nombreux auteurs qu'un défaut d'expression et/ou de fonctionnalité du CFTR dans la membrane apicale des cellules épithéliales est à l'origine d'une hyperabsorption d'ions Na^+ et d'eau. Toutefois, deux études relativement récentes remettent en cause ce concept et indiquent que l'absorption excessive d'ions Na^+ n'existe pas dans les voies aériennes CF (Chen *et al.*, 2010, Itani *et al.*, 2011). Par ailleurs, Euka *et al.*, décrivent une distribution différente

A.



B.

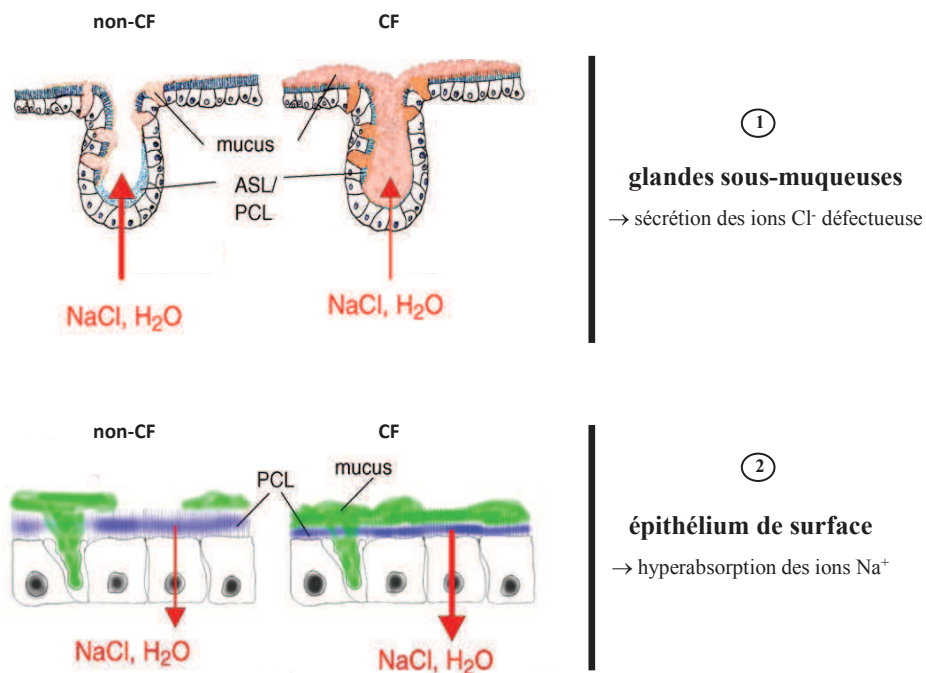


Figure 17 (A-B) : Quel modèle pour la pathologie pulmonaire dans la mucoviscidose ?

A. L'épithélium de surface des voies aériennes est composé de plusieurs types cellulaires (cellules ciliées, caliciformes, intermédiaires, basales, de Clara et neuroendocrines) et serait impliqué dans la réabsorption des électrolytes. L'épithélium des glandes sous-muqueuses consiste en une partie proximale muqueuse et une partie distale séreuse. Il est engagé, entre autres, dans la sécrétion des électrolytes, laquelle contribue à la formation de la fine couche de liquide recouvrant la surface des voies aériennes. L'équilibre entre les phénomènes de sécrétion et d'absorption détermine le degré d'hydratation de l'ASL, dont dépend l'efficacité de la clairance mucociliaire. B. À ce jour la question n'est toujours pas tranchée de savoir si c'est le défaut de sécrétion des ions Cl^- , médiée par le CFTR principalement au niveau des glandes sous-muqueuses (1), ou l'hyperabsorption des ions Na^+ et d'eau par l'épithélium de surface (2), qui compromet le transport de mucus conduisant à l'infection bactérienne observée dans les poumons des patients.

ASL : liquide de surface des voies aériennes (airway surface liquid), CF : cystic fibrosis, CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance, Cl^- : ion chlorure, LB : lame basale, Na^+ : ion sodium, PCL : liquide périciliaire (periciliary liquid)

A. d'après la thèse de T. Jolly, 2010 (référence tel non disponible), B. adaptée de la revue de Kunzelmann et Schreiber, 2012

des protéines CFTR et ENaC au niveau des cellules ciliées de l'épithélium bronchique humain. Alors que le CFTR est observé dans la membrane apicale de ces cellules, le canal ENaC serait, quant à lui, exprimé au niveau des cils vibratiles (Enuka *et al.*, 2012). Ces observations continuent d'alimenter le débat quant à la contribution du canal ENaC dans le développement de la maladie pulmonaire dans la mucoviscidose (**Figure 17**). Cette dernière est-elle causée par une trop faible sécrétion anionique (Cl^-) au niveau des glandes sous-muqueuses ou par une trop forte absorption des électrolytes (Na^+) par l'épithélium de surface ? (Collawn *et al.*, 2012, pour revue : Kunzelmann et Schreiber, 2012).

À l'heure actuelle, deux modèles sont proposés pour expliquer la mise en place de la pathogenèse pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. D'un côté, le défaut de transport des ions Cl^- (médié par le CFTR) conduirait à une modification de la composition de l'ASL. Inactivant les peptides antimicrobiens, elle rendrait les voies aériennes incapables de se défendre contre les attaques bactériennes (Smith *et al.*, 1996). De l'autre, l'absence ou un canal CFTR non fonctionnel à la surface apicale de l'épithélium des voies aériennes va : i) compromettre la production du PCL par les glandes sous-muqueuses (sécrétion Cl^- diminuée) et ii) altérer l'ajustement du volume du PCL par l'épithélium de surface (absorption Na^+ et eau augmentée). Contribuant à la déshydratation de l'ASL, ces défauts vont fortement impacter l'efficacité du transport du mucus et de la clairance bactérienne (Matsui *et al.*, 1998, Collawn *et al.*, 2012, pour revues : Frizzell et Hanrahan, 2012). Ce deuxième modèle, incriminant l'absence d'interaction fonctionnelle entre CFTR et ENaC dans le développement de la maladie pulmonaire, rejoint le concept généralement accepté par la communauté scientifique.

4.2.4. Le CFTR et le canal calcique TRPC6

L'épithélium respiratoire CF présente un contrôle anormal de l'homéostasie calcique intracellulaire. La stimulation de cellules CF par des agonistes du calcium, comme l'ATP ou l'histamine, conduit à une mobilisation calcique plus importante que dans des cellules non-CF. Toutefois, une normalisation des réponses calciques est observée suite au réadressage de la protéine CFTR-F508del à la membrane plasmique (Antigny *et al.*, 2008a,b, pour revue : Antigny *et al.*, 2011).

Afin d'expliquer le lien entre les niveaux anormaux de calcium observés dans les cellules CF et le défaut d'expression et/ou de fonctionnalité du CFTR, un couplage entre les canaux CFTR et TRPC6 (*transient receptor potentiel canonical*) a été proposé (Antigny *et al.*, 2010). Ce dernier appartient à la famille des canaux TRP, impliqués dans l'entrée des ions Ca^{2+} dans les cellules. TRPC6 est l'une des isoformes les plus exprimées dans les lignées cellulaires épithéliales MM39 (non-CF) et CF-KM4 (CF), où il est présent, avec le CFTR, au sein d'un même complexe protéique. Par ailleurs, l'utilisation de siRNA-CFTR dans les cellules non-CF entraîne une augmentation de l'influx calcique dépendant de TRPC6, reproduisant ainsi le scénario observé dans les cellules CF. Ces résultats démontrent l'importance de la présence du CFTR à la membrane pour la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire par le canal TRPC6 (Antigny *et al.*, 2010). Cette régulation s'avérerait bidirectionnelle puisque l'utilisation de siRNA-TRPC6 dans les cellules non-CF conduit à une diminution de l'activité du canal CFTR. Il est à noter que ce lien fonctionnel a également été observé dans des cultures primaires de cellules épithéliales pulmonaires (Antigny *et al.*, 2010).

4.2.5. Le CFTR et les échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

L'ion HCO_3^- est un constituant majeur des liquides sécrétés par les épithélia du tractus respiratoire, digestif et reproducteur. En plus de jouer son rôle de tampon, il affecte la solubilité de macromolécules (enzymes digestives, mucines) et d'ions dans les fluides biologiques (Ishiguro *et al.*, 2007, pour revue : Li et Naren, 2010). À titre d'exemple, la viscosité des mucines est fortement influencée par le pH du fluide dans lequel elles sont sécrétées, l'acidification de ce dernier contribuant à leur hyperviscosité (Krouse *et al.*, 2004).

Le transport des ions HCO_3^- est assuré par le canal CFTR et des échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ tels les transporteurs anioniques SLC26 (*solute carrier 26*) (Ishiguro *et al.*, 2007, pour revue : Lee *et al.*, 2001). Le CFTR est aussi impliqué indirectement dans le contrôle de l'homéostasie des ions HCO_3^- , en exerçant une activité régulatrice sur certains membres de la famille des SLC26, dont SLC26A3 (DRA) et SLC26A6 (PAT1). Une corrélation entre la stimulation du CFTR par l'AMPc et l'augmentation des échanges $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ a notamment été rapportée au niveau des canaux pancréatiques de souris. Une nouvelle fois, l'interaction fonctionnelle entre ces différentes entités repose sur la mise en place d'un complexe macromoléculaire apical engageant NHERF1 (Gray, 2004, Singh *et al.*, 2009). Ce couplage semble réciproque. En effet, la présence de SLC26A3 augmente considérablement la P_o du canal CFTR. Des interactions entre les domaines R du CFTR et STAS (*sulfate transporter antagonist of anti-sigma factor*) des transporteurs SLC26 permettraient une amélioration mutuelle de leur activité respective (Ko *et al.*, 2002, Ko *et al.*, 2004).

Plus récemment, un couplage physique et fonctionnel a été observé entre le canal CFTR et le transporteur anionique SLC26A8 (TAT1). Ce complexe moléculaire serait impliqué dans la régulation du transport des ions Cl^- et HCO_3^- lors de la capacitation des spermatozoïdes (Rode *et al.*, 2012).

Enfin, un lien fonctionnel entre le CFTR et un autre membre des SLC26 a été mis en évidence dans l'épithélium bronchique. Il s'agit du SLC26A9, principalement considéré comme un canal chlorure et présentant une conductance minimale pour les ions HCO_3^- . Des travaux démontrent sa régulation par les WNKs (*with no lysine kinases*) mais également par la protéine CFTR (Dorwart *et al.*, 2007, Bertrand *et al.*, 2009). SLC26A9 contribue à la sécrétion constitutive et dépendante de l'AMPc des ions Cl^- à travers l'épithélium bronchique humain, activité qui requiert néanmoins la présence d'un CFTR fonctionnel dans la membrane apicale (Bertrand *et al.*, 2009). Cette régulation serait bidirectionnelle et impliquerait un lien physique entre les deux canaux ioniques. En effet, SLC26A9 et le CFTR semblent exister au sein d'un même complexe protéique et SLC26A9 stimulerait l'expression et l'activité canal chlorure du CFTR dans des lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines (Avella *et al.*, 2010).

4.2.6. Le CFTR et les aquaporines

Les mouvements d'eau à travers les épithélia sont régulés par le transport des électrolytes et s'effectuent suivant le gradient de pression osmotique. Ces mouvements peuvent se faire par des voies de type paracellulaire, mais également en utilisant des canaux appelés aquaporines (AQPs).

Ces protéines forment des pores dans les membranes cellulaires et permettent, en plus du transport de l'eau, celui d'une grande variété de solutés (glycérol, mannitol, sorbitol) de part et d'autre de la membrane (pour revue : Li et Naren, 2010).

L'augmentation de la perméabilité à l'eau observée dans des ovocytes de Xénope suite à l'expression et à l'activation du CFTR, suggère son engagement dans la régulation positive des aquaporines (Schreiber *et al.*, 1999b, Schreiber *et al.*, 2000). La relation entre le CFTR et l'AQP9 est peut-être la mieux caractérisée. L'AQP9 est une aquaporine majeure du système reproducteur masculin, exprimée de manière constitutive dans l'épithélium de l'épididyme (Pastor-Soler *et al.*, 2001, Pietrement *et al.*, 2008). La perméabilité à l'eau d'ovocytes de Xénope est potentialisée suite à la co-expression du CFTR et de l'AQP9 de l'épididyme de rat (Cheung *et al.*, 2003). De plus, colocalisées dans les cellules principales de l'épididyme et du canal déférent, l'inhibition du CFTR conduit à une perméabilité altérée au glycérol (Pietrement *et al.*, 2008). Ces différentes observations démontrent l'importante activité régulatrice du CFTR sur l'AQP9. Par ailleurs, l'existence du complexe macromoléculaire CFTR/NHERF1/AQP9 faciliterait l'activation de l'AQP9 par l'AMPc (pour revue : Li et Naren, 2010).

Il est alors tout à fait possible d'imaginer, qu'en impactant la composition du fluide luminal de l'épididyme, la perturbation de la coopération entre le CFTR et l'AQP9 contribue à la pathogenèse de l'infertilité masculine dans la mucoviscidose.

4.3. Autres fonctions du CFTR

La protéine CFTR participe à de nombreux processus biologiques, qui sont pour la plupart intimement liés à ses fonctions de canal ionique (Cl^- , HCO_3^- et SCN^-) et de protéine régulatrice de canaux ioniques et transporteurs.

Le CFTR est impliqué dans la régulation du volume cellulaire (Vennekens *et al.*, 1999, Ando-Akatsuka *et al.*, 2002) et dans certains événements liés aux membranes, comme l'exocytose des vésicules de sécrétion et la fusion des endosomes (Montserrat *et al.*, 1996, Biwersi *et al.*, 1996). Par ailleurs, un défaut d'expression et/ou de fonctionnalité du canal peut affecter le transcriptome (Xu *et al.*, 2003) et la résistance transépithéliale (LeSimple *et al.*, 2010). Le CFTR modulerait aussi la communication intercellulaire, s'expliquant par l'activité régulatrice qu'il exerce sur les jonctions communicantes (Chanson *et al.*, 1996, Brezillon *et al.*, 1997, Chanson *et al.*, 1999). À ce propos, une interaction physique et fonctionnelle entre le CFTR et certaines connexines (Cxs), telle que la Cx45, a été démontrée (Kotsias et Perracchia, 2005). La protéine CFTR est également engagée dans la régulation du pH (intra et extracellulaire) et joue un rôle important dans la réponse inflammatoire. Seuls ces deux derniers points seront développés ici.

4.3.1. Régulation du pH

L'acidification de certains compartiments intracellulaires est influencée par la présence du CFTR. C'est le cas des phagolysosomes des macrophages alvéolaires, où un environnement acide est nécessaire à l'activité des enzymes protéolytiques engagées dans l'élimination des bactéries

internalisées (Di *et al.*, 2006). Chez les patients, un défaut d'expression du CFTR dans la membrane phagolysosomale se traduit donc par une digestion défectueuse des bactéries phagocytées (Di *et al.*, 2006, Swanson, 2006).

En contrôlant la neutralisation de l'acidité gastrique intraluminale, le CFTR garantit une action optimale des enzymes digestives. Enfin, le pH du liquide de surface des épithélia respiratoire et digestif influence fortement les propriétés physico-chimiques des mucines sécrétées et, de ce fait, les propriétés rhéologiques du mucus (Krouse *et al.*, 2004, pour revue : Riordan *et al.*, 2008).

4.3.2. Rôle dans l'inflammation

Dans la mucoviscidose, la maladie pulmonaire se définit par des infections bactériennes chroniques et une réponse inflammatoire anormalement élevée. Malgré le développement de nombreux modèles d'études cellulaires et animaux, la question de savoir si l'inflammation précède ou non l'infection initiale n'est toujours pas tranchée. D'un côté, la colonisation bactérienne des voies aériennes serait l'évènement initiateur à l'origine de la mise en place du processus inflammatoire. De l'autre, des études démontrent l'existence d'un état pro-inflammatoire intrinsèque dans les voies aériennes des malades, avec une augmentation des marqueurs de l'inflammation (activation de la voie NF- κ B, *nuclear factor kappa-B*) en absence même d'infection (Verhaeghe *et al.*, 2007). Cet état, observé précocement, aggrave l'obstruction des voies aériennes, laquelle favorise les infections bactériennes qui exacerbent la réponse inflammatoire.

Depuis quelques années, des travaux rapportent une implication directe de la protéine CFTR dans ce processus. Cette dernière présenterait des propriétés pro- ou anti-inflammatoires, selon qu'elle soit normale ou mutée.

Lors d'un stress du RE, la mise en place de l'UPR (*unfolded protein response*) peut à son tour activer la réponse inflammatoire, via la stimulation de la voie NF- κ B par les cascades de signalisation associées aux trois protéines « senseurs » : IRE1 (*inositol requiring 1*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) et PERK (*PKR like endoplasmic reticulum kinase*) (pour revue : Kitamura *et al.*, 2011). Une surexpression de certains marqueurs de l'UPR, tels que les chaperonnes GRP78 et GRP94 (*glucose-regulated protein, 78 or 94 kDa*) et la protéine effectrice ATF6, a été décrite dans des cellules exprimant le mutant F508del de la protéine CFTR (Kerbiriou *et al.*, 2007, Bartoszewski *et al.*, 2008, Gomes-Alves *et al.*, 2010). De telles observations apportent la preuve qu'un stress du RE est bien induit dans ces cellules. Il est alors tout à fait possible d'imaginer que, dans certaines conditions, le déclenchement de l'UPR peut contribuer à la réponse inflammatoire exagérée observée au niveau de l'épithélium bronchique des malades.

D'autres travaux montrent, pour leur part, le rôle essentiel joué par le CFTR-wt apical dans le contrôle de l'inflammation. Des cellules non-CF traitées avec un inhibiteur spécifique du CFTR, le CFTR_{inh172}, présentent une activation de la voie NF- κ B. Celle-ci se reflète par l'augmentation de la production d'interleukines pro-inflammatoires comme l'interleukine 8 (Perez *et al.*, 2007, Vij *et al.*, 2009, Hunter *et al.*, 2010). Ces constatations suggèrent que le CFTR possède une activité anti-inflammatoire intrinsèque, laquelle s'expliquerait par l'action inhibitrice qu'il exerce sur certains

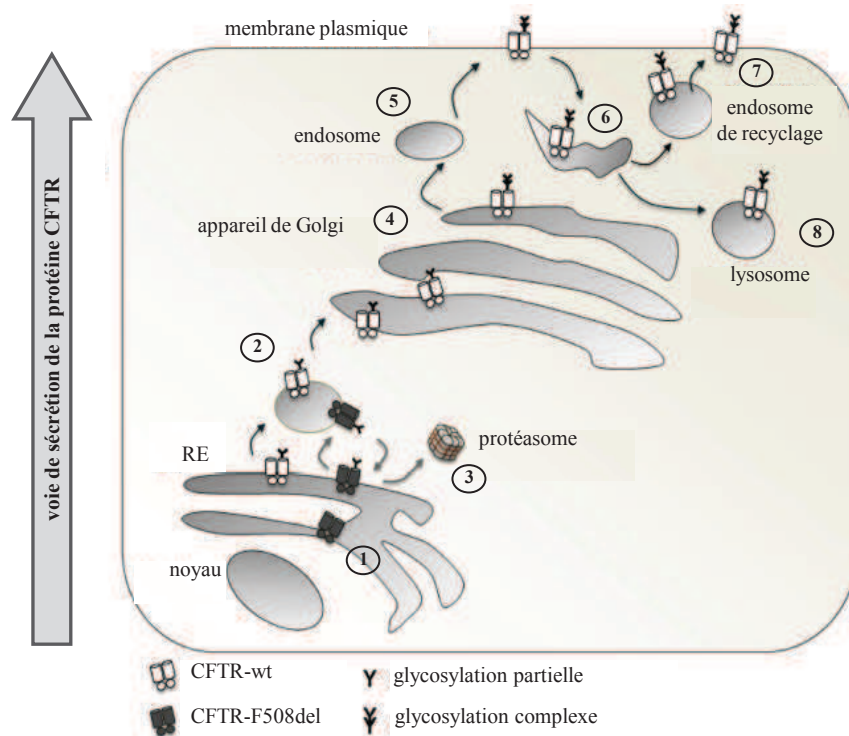


Figure 18 : Processus de biosynthèse et transport intracellulaire de la protéine CFTR

Est schématisé ici le parcours la protéine CFTR, depuis sa biogenèse dans le RE jusqu'à son recyclage apical :

- 1- biosynthèse de la chaîne polypeptidique dans le RE : repliement co- et post-traductionnel, glycosylation partielle
- 2- transport des précurseurs immatures présentant une conformation correcte vers l'appareil de Golgi
- 3- dégradation des précurseurs mal conformés (ex : CFTR-F508del) par la voie ubiquitine-protéasome
- 4- achèvement de la maturation de la protéine CFTR dans l'appareil de Golgi, glycosylation complexe
- 5- transport vésiculaire depuis le réseau *trans*-golgien vers la membrane apicale
- 6- internalisation rapide clathérine-dépendante
- 7- recyclage efficace de la protéine CFTR depuis les endosomes de recyclage
- 8- dégradation lysosomale

Remarque : attention, sur ce schéma certaines molécules CFTR ne sont pas orientées dans le bon sens. Lors de la biosynthèse, les ECLs sont normalement localisées dans la lumière du RE alors que NBD1, le domaine R et NBD2 sont quant à eux cytosoliques (face externe de la membrane du RE).

ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), RE : réticulum endoplasmique

adaptée de la revue de Molinski et al., 2012

récepteurs membranaires [TNFR1 (récepteur au $\text{TNF}\alpha$), IL-1 β R (*interleukin-1 receptor*) et TLR (*toll like receptor*)] (Bodas et Vij, 2010). Ainsi, le phénomène inflammatoire exacerbé rencontré dans les voies respiratoires des malades pourrait également s'expliquer par la perte d'activité du canal CFTR à la surface cellulaire.

5. La voie de sécrétion de la protéine CFTR : du RE à la membrane apicale

Comme toute protéine membranaire, le canal CFTR devra franchir de multiples étapes avant d'atteindre la membrane apicale des cellules épithéliales (**Figure 18**). Dès sa biosynthèse dans le RE, il devra satisfaire un certain nombre de critères lui permettant d'être exporté vers l'appareil de Golgi, où il complètera sa maturation.

La présence du CFTR à la surface cellulaire sera modulée par les multiples partenariats mis en place, depuis sa biogenèse et tout au long de son transport intracellulaire. Inséré dans la membrane apicale, l'activité du canal sera également régulée par de nombreuses interactions protéine-protéine, s'établissant, pour la plupart, par l'intermédiaire des extrémités N- et C-terminales du CFTR.

5.1. Biosynthèse de la protéine CFTR : étapes précoces de la voie de sécrétion

Dans les cellules eucaryotes, la majorité des protéines membranaires est synthétisée dans le RE, ceci par l'intervention de la particule de reconnaissance du peptide signal (SRP, *signal recognition particle*). Cette dernière reconnaît une séquence d'adressage située sur la chaîne polypeptidique naissante, permettant : i) l'ancrage du complexe ARNm/ribosome (ou RNC, *ribosome nascent chain complex*) au niveau de la membrane du RE et ii) son transfert vers le translocon Sec61, formant ainsi le complexe ribosome/translocon (RTC, *ribosome translocon complex*). En tant que protéine membranaire, le CFTR répond également à ce processus de biosynthèse. Sa translocation dans le RE est initiée, selon les modèles, par l'insertion dans la bicouche lipidique du RE du segment transmembranaire TM1 ou TM2 (pour revue : Kim et Skach, 2012).

L'assemblage de la protéine CFTR repose sur un repliement coordonné des domaines individuels et sur l'établissement de contacts interdomaines essentiels à l'élaboration d'une structure physiologiquement stable. Ces contacts se mettent en place dans trois compartiments cellulaires distincts : la lumière du RE, la membrane du RE et le cytosol.

Lors de sa biogenèse, le repliement et l'assemblage de la protéine CFTR sont surveillés par le système de contrôle de qualité du RE (ERQC, *endoplasmic reticulum quality control*) (Wang *et al.*, 2006, Skach, 2006). En s'associant aux polypeptides naissants et néo-synthétisés, ces chaperons et co-chaperons facilitent le repliement des domaines du CFTR et promeuvent un assemblage correct de la protéine. À ce stade, si cette dernière satisfait le système ERQC, elle quitte le RE pour rejoindre l'appareil de Golgi. Si les précurseurs se trouvent dans l'incapacité d'adopter un niveau de conformation correct, ils pourront être reconnus par ces mêmes chaperons et rapidement dirigés vers la voie ubiquitine-protéasome. Ce processus est connu sous le nom de système de dégradation

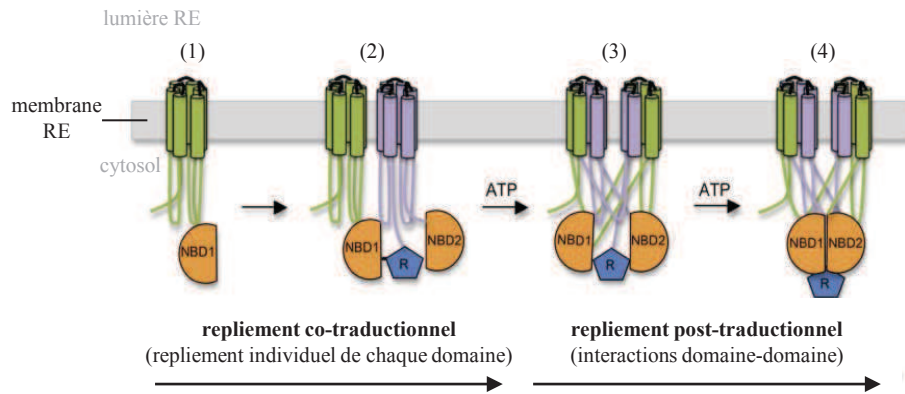


Figure 19 : Modèle du processus d'assemblage de la protéine CFTR

Le repliement de la protéine CFTR commence de manière co-traductionnelle (1→2) et se poursuit par la formation post-traductionnelle des contacts interdomaines (3→4).

ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), R : domaine régulateur, RE : réticulum endoplasmique

adaptée de la revue de Kim et Skach, 2012

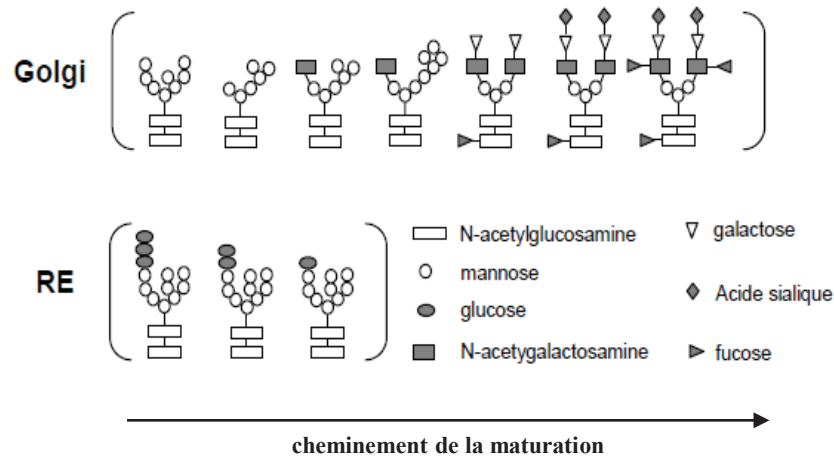


Figure 20 : Modifications de la chaîne oligosaccharidique au cours de la maturation de la protéine CFTR

La maturation de la protéine CFTR est initiée, de manière co-traductionnelle, par le branchement de deux chaînes oligosaccharidiques sur les résidus asparagine N894 et N900 localisés sur l'ECL4 (= N-glycosylation). Composées de 14 unités (deux N-acétylglucosamines, neuf mannoses, et trois glucoses), elles seront vite modifiées dans le RE par l'action des glucosidases I et II. Ces motifs glucidiques riches en mannose vont par la suite subir de nouvelles modifications dans l'appareil de Golgi. Elles reposent, entre autres, sur le remplacement des mannoses par des sucres complexes, permettant d'obtenir la forme mature de la protéine CFTR.

CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, ECL4 : boucle extracellulaire n°4 (*extra-cellular loop*), RE : réticulum endoplasmique

d'après la revue de Amaral, 2004

associé au RE (ERAD, *endoplasmic reticulum-associated degradation*) (pour revue : Kim et Skach, 2012).

5.1.1. Assemblage et glycosylation de la protéine CFTR

a. Un assemblage coopératif des domaines de la protéine CFTR

Basé sur le temps requis par la protéine CFTR pour sortir du RE, l'assemblage complet des domaines du CFTR durerait entre 30 et 120 minutes. Selon le modèle retenu à l'heure actuelle (**Figure 19**), l'insertion des segments transmembranaires dans la membrane du RE ainsi que le repliement individuel de chaque domaine s'opèrent de manière co-traductionnelle. L'assemblage global de la protéine CFTR se poursuit par la formation, post-traductionnelle, des contacts interdomaines nécessaires à une structure tertiaire stable (Du *et al.*, 2005, Cui *et al.*, 2007, Du et Lukacs, 2009). Un repliement correct de chaque domaine du CFTR est primordial pour un assemblage approprié des domaines (pour revue : Kim et Skach, 2012).

b. La N-glycosylation de la protéine CFTR

Le processus de maturation de la protéine CFTR repose sur différentes étapes de glycosylation (**Figure 20**). Ces dernières débutent dans le RE, de manière co-traductionnelle, et s'achèvent dans l'appareil de Golgi (Cheng *et al.*, 1990).

Selon son état de glycosylation, trois formes de CFTR peuvent être observées (A, B et C), distinguables par leur sensibilité à l'endoglycosidase H (Cheng *et al.*, 1990, Lukacs *et al.*, 1994). La **forme A**, d'environ 130 kDa, correspond à la chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée et donc non glycosylée. Cette dernière est rapidement modifiée par le branchement au niveau des résidus asparagine N894 et N900 d'une chaîne oligosaccharidique constituée de 14 unités [deux N-acétylglucosamines (GlcNAc), neuf mannoses (Man) et trois glucoses (Glc)]. La protéine CFTR présente alors un poids moléculaire d'environ 145 kDa, correspondant à la **forme B** partiellement glycosylée (*core glycosylated*). Suite à l'action des glucosidases I et II, le précurseur va quitter le RE. La protéine CFTR rejoint alors l'appareil de Golgi, où elle va subir de nouvelles modifications de ses chaînes oligosaccharidiques, notamment le remplacement des mannoses par des glucides complexes via l'action des glycosyltransférases. C'est donc dans cet organite que le CFTR acquiert sa forme entièrement glycosylée (*fully glycosylated* ou *complex glycosylated*), de poids moléculaire d'environ 170 kDa. Elle est appelée **forme C**. Contrairement à la forme B, la forme C est résistante à l'endoglycosidase H mais montre une sensibilité à la peptide:N-glycanase F. Une **forme B'** peut parfois être mentionnée par certains auteurs. Celle-ci correspond au tiers de précurseurs du CFTR-wt ayant acquit dans le RE une conformation (maturation ATP-dépendante) leur permettant de progresser vers l'appareil de Golgi. Les deux tiers restants (forme B) sont, quant à eux, rapidement dégradés (Lukacs *et al.*, 1994).

- Propriétés de la N-glycosylation

La N-glycosylation est l'une des modifications les plus communément observées lors de la biosynthèse des protéines. Elle joue un rôle essentiel dans l'expression membranaire des glycoprotéines, en favorisant leur repliement, leur transport intracellulaire et leur stabilité.

Les chaînes oligosaccharidiques, notamment les formes monoglycosylées, sont reconnues par des lectines comme la calnexine (CNX), un chaperon moléculaire de la lumière du RE. Cette association facilite le repliement des glycoprotéines et perdure dans le RE jusqu'à ce qu'elles complètent leur maturation conformationnelle, d'où le terme souvent employé de « cycle de la calnexine » (pour revues : Helenius et Aebi, 2001, Helenius et Aebi, 2004). L'absence de N-glycosylation perturbe l'assemblage de la protéine CFTR (Farinha et Amaral, 2005) et sa stabilité, diminuant significativement son temps de demi-vie dans les compartiments post-RE (Chang *et al.*, 2008). De plus, le niveau d'expression de la forme entièrement glycosylée du CFTR n'est que modestement diminué dans des cellules déplétées en CNX (Farinha et Amaral, 2005, Okiyoneda *et al.*, 2008, Rosser *et al.*, 2008). Ceci suggérerait pour les N-glycanes un rôle dans la biogenèse du canal CFTR. Néanmoins, la protéine CFTR non glycosylée est capable d'atteindre la surface cellulaire, où elle assure un transport ionique. Les chaînes oligosaccharidiques ne sont donc pas les principaux déterminants de l'export de la protéine (Chang *et al.*, 2008).

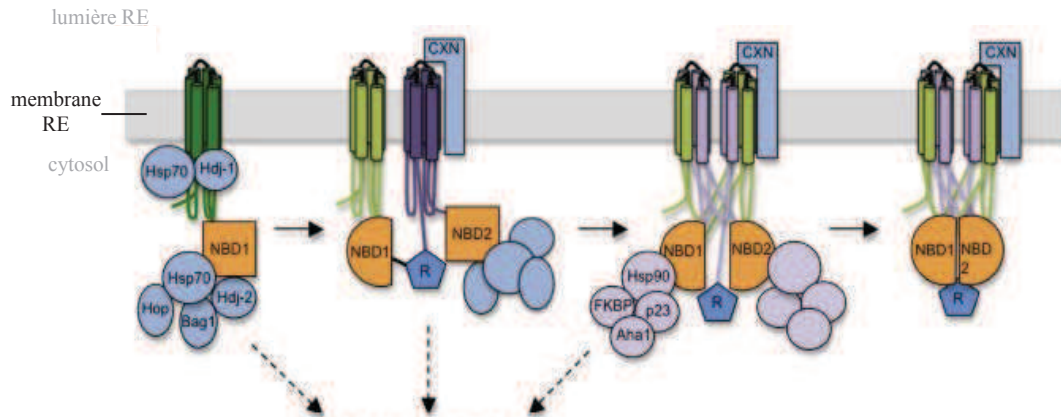
En cohérence avec ces observations, l'équipe de G.L. Lukacs a montré que les N-glycanes, plus spécifiquement les glycanes de base (*core glycans*), amélioraient le repliement et la stabilité conformationnelle de la protéine CFTR, indépendamment de la CNX (Glozman *et al.*, 2009).

c. La biosynthèse de la protéine CFTR : un processus peu efficace

Dès le début des années 1990, des investigations révèlent que seule une faible proportion de polypeptides nouvellement synthétisés dans le RE est capable d'être transformée en CFTR mature. En effet, seulement un tiers des précurseurs atteignent un niveau de conformation correct dans le RE (Lukacs *et al.*, 1994, Ward et Kopito, 1994). Les deux tiers restants, mal conformés, sont rapidement dégradés par le protéasome 26S (Jensen *et al.*, 1995, Ward *et al.*, 1995).

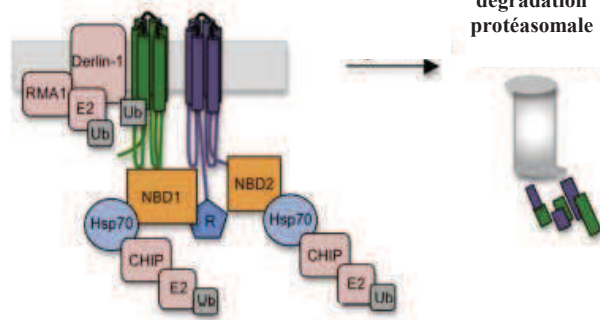
Compte tenu de l'expression endogène relativement limitée de la protéine CFTR dans certains épithélia, la majorité des observations décrites ci-dessus a été faite à partir de travaux menés dans des systèmes d'expression hétérologues. Toutefois, des résultats similaires ont également été retrouvés dans des cellules exprimant la forme sauvage de la protéine CFTR de façon endogène, telles les lignées HT-29 et T84 (Ward et Kopito, 1994). Ainsi, la faible efficacité de repliement du CFTR immature serait une propriété intrinsèque de la protéine, ceci indépendamment du modèle d'étude (Ward et Kopito, 1994). Comparativement à d'autres versions sauvages de transporteurs ABC, comme la glycoprotéine P ou la MRP1 (*multidrug resistance-associated protein*), qui mûrissent et sont adressés à la membrane apicale avec une efficacité proche de 100 %, celle du CFTR se rapproche, dans le même type cellulaire, de 33 % (pour revue : Riordan, 2008). Une hypothèse avancée pour expliquer cette différence est la présence d'un domaine R non structuré, spécifique à la protéine CFTR (Ostegaard *et al.*, 2000, Baker *et al.*, 2007). Cette dernière a néanmoins été invalidée

A.



B.

protéines malconformées



dégradation
protéasomale

Figure 21 (A-B) : Rôle des chaperons moléculaires dans l'aide au repliement et le ciblage des protéines CFTR mal conformées vers la dégradation

A. Les couples Hdj-1/Hsp70, Hdj-2/Hsc70, Hsp90/Aha1 ou encore la CNX interviennent progressivement au cours de la biosynthèse du CFTR. **B.** L'incapacité des polypeptides naissants et néo-synthétisés à adopter une conformation correcte est détectée par leur liaison prolongée avec ces mêmes chaperons, notamment Hsp/c70. Cela va permettre le recrutement de ligases E3, telles CHIP ou RMA1, engagées dans l'ubiquitination des protéines mal conformées.

Aha1 : *activator of Hsp90 ATPase homologue 1*, ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, CHIP : *C-terminus of Hsc70-interacting protein*, FKBP : *FK506-binding protein*, Hdj-1 & Hdj-2 : *Human DnaJ homologue 1 & 2*, Hop : *Hsc70/Hsp90-organizing protein*, Bag1 : *Bcl2-associated athanogene 1*, Hsp70 & 90 : *heat shock protein 70 & 90*, Hsc70 : *heat shock cognate protein 70*, NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), R : domaine régulateur, RE : réticulum endoplasmique

adaptée de la revue de Kim et Skach, 2012

par des travaux montrant que la délétion de grandes portions du domaine R n'améliorait par l'export à partir du RE des précurseurs (Baldursson *et al.*, 2001, pour revue : Riordan, 2008).

La cause sous-jacente du repliement inefficace du CFTR-wt demeure à ce jour énigmatique. L'instabilité énergétique des NBDs, la faible vitesse d'assemblage des domaines et la mise en place rapide du système ERAD, sont quelques-unes des pistes discutées pour expliquer la faible efficacité d'acquisition d'une conformation correcte dans le RE (pour revue : Lukacs et Verkman, 2012).

Enfin, bien que confirmant les observations faites initialement dans les systèmes d'expression hétérologues (Ward et Kopito, 1994), Varga et collaborateurs n'arrivent pas à la même conclusion concernant les modèles cellulaires exprimant le CFTR de manière endogène. Dans les lignées cellulaires épithéliales T84 et Calu-3, près de 100 % des molécules CFTR synthétisées acquièrent leur glycosylation finale (Varga *et al.*, 2004).

5.1.2. Le contrôle de l'état de conformation du CFTR naissant et néo-synthétisé

S'insérant dans la bicouche lipidique du RE lors de sa biosynthèse, les différentes étapes du repliement du CFTR sont contrôlées par un réseau de chaperons et co-chaperons moléculaires, localisé de part et d'autre de la membrane du RE (Wang *et al.*, 2006).

Près d'une trentaine de partenaires a été répertoriée. Des membres de la famille des protéines de choc thermique tels que Hsp/c70 et Hsp90 (Hsp, *heat shock protein 70 or 90* ; Hsc : *heat shock cognate protein 70*), accompagnées de leur co-chaperon respectif Hdj-1, Hdj-2 (*Human DnaJ homologue 1 & 2*) et Aha1 (*activator of Hsp90 ATPase homologue 1*), sont retrouvés au niveau cytosolique (Yang *et al.*, 1993, Loo *et al.*, 1998, Meacham *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2006, pour revue : Kim et Skach, 2012). Des lectines comme la CNX et la calréticuline sont, quant à elles, décrites comme chaperons du CFTR dans la lumière du RE (Pind *et al.*, 1994, Harada *et al.*, 2006).

a. Le repliement séquentiel du CFTR assisté par les chaperons moléculaires (Figure 21.A)

Les couples Hdj-1/Hsp70 et Hdj-2/Hsc70 interagissent avec le CFTR lors des étapes précoces de sa biogenèse, facilitant son repliement co-traductionnel et stabilisant les précurseurs (Meacham *et al.*, 1999, Farinha *et al.*, 2002). Le complexe Hdj-2/Hsc70 interagirait avec le polypeptide naissant, suite à la synthèse du NBD1. Cette association stabilise ce domaine aussi bien que son interaction avec le domaine R (Meacham *et al.*, 1999). Hsp90 occupe une place déterminante dans le repliement du CFTR (Loo *et al.*, 1998). Elle serait recrutée par Hsp/c70 et engagée dans la stabilisation des précurseurs. Tout comme Hsp/c70, la liaison de Hsp90 au CFTR est dépendante de son activité ATPasique, laquelle est régulée par de nombreux co-chaperons (pour revue : Pearl et Prodromou, 2006), et notamment Aha1. Bien qu'il soit aujourd'hui accepté que la présence du complexe Aha1/Hsp90 est essentielle pour un repliement efficace du CFTR, les mécanismes sous-jacents demandent à être précisés (Wang *et al.*, 2006). La CNX semble intervenir lors d'étapes plus tardives de la biosynthèse. La liaison de cette lectine aux chaînes oligosaccharidiques branchées sur l'ECL4 stabiliserait TMD2 et faciliterait la formation et la stabilisation de l'interaction entre TMD1 et TMD2 (Rosser *et al.*, 2008).

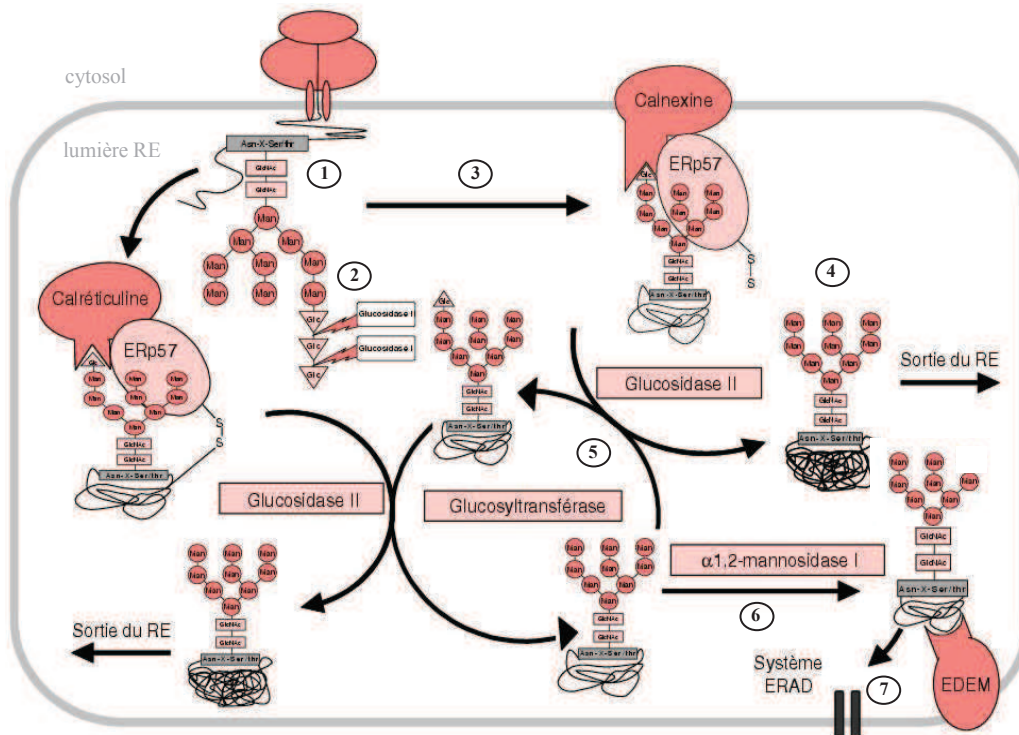


Figure 22 : Représentation schématique du « cycle de la calnexine »

Oltre l'action de la machinerie Hsp/c70, un autre point de contrôle permet de diriger les protéines mal conformées vers le système ERAD. Celui-ci repose sur l'entrée des molécules immatures de CFTR dans le « cycle de la calnexine/calréticuline ». Seuls les N-glycanes monoglycosylés sont reconnus par ces lectines, accompagnées de la protéine ERp57, un chaperon de la famille PDI.

Exemple de contrôle médié par la lectine CNX :

- 1- branchement de la chaîne oligosaccharidique (2 GlcNAc-9 Man-3 Glc) sur un résidu asparagine
- 2- action des glucosidases I et II : obtention d'un N-glycane monoglycosylé
- 3- reconnaissance de ce motif glucidique par la CNX : aide au repliement des précurseurs immatures
- 4- action de la glucosidase II : si la protéine présente une conformation correcte elle sera exportée hors du RE
- 5- action de l'UGGT : reglycosylation qui entraîne de nouveau la reconnaissance du précurseur immature par la calnexine
- 6- action de la mannosidase I : intervient quand le cycle de déglycosylation/glycosylation perdure, traduisant l'incapacité du précurseur à adopter une conformation correcte
- 7- reconnaissance de la chaîne oligosaccharidique réduite à huit résidus mannoses par la lectine EDEM, qui oriente les protéines mal conformées vers l'ERAD

ER : *endoplasmic reticulum*, EDEM : *ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein*, ERAD : *ER-associated degradation*, Glc : glucose, GlcNAc : N-acétylglucosamine, Hsp70 : *heat shock protein 70*, Hsc70 : *heat shock cognate protein 70*, Man : mannose, PDI : *protein disulfide isomerase*, RE : *réticulum endoplasmique*, UDP : *uridine diphosphate*, UGGT : *(UDP)-glucose glycoprotéine glucosyltransférase*

adaptée de http://www.jle.com/fr/revues/bio_rech/vir/e-docs/00/04/02/3F/texte_alt_205sl.jpg

b. La dégradation ubiquitine-dépendante des précurseurs mal conformés

Hsp/c70 est un chaperon cytosolique particulièrement impliqué dans le ciblage des polypeptides CFTR incapables d'acquiescer une conformation correcte dans le RE. La promotion du système ERAD par Hsc70 implique son association avec le co-chaperon CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting protein*). Cette E3 ubiquitine-ligase fonctionne de concert avec UbcH5, une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) (Meacham *et al.*, 2001, Younger *et al.*, 2004) (**Figure 21.B**). D'autres ubiquitine-ligases sont également engagées dans l'ubiquitination (chaperon-dépendante ou indépendante) des polypeptides CFTR incorrectement repliés comme RMA1, Gp78, Nedd4-2 ou encore Fbs1 (Morito *et al.*, 2008, Caohuy *et al.*, 2009, pour revue : Lukacs et Verkman, 2012).

Alors que le complexe RMA1(E3)/Ubc6e(E2)/Derlin-1 est capable d'initier l'ubiquitination des précurseurs mal repliés de manière co-translationnelle, l'ubiquitine-ligase CHIP interviendrait plus tardivement en reconnaissant préférentiellement des molécules CFTR entières mal conformées (Younger *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent un rôle complémentaire des protéines RMA1 et CHIP dans la surveillance des polypeptides CFTR naissants et néo-synthétisés.

Il a été proposé par certains auteurs que la machinerie Hsp/c70 constituait un premier point de contrôle dans l'évaluation de la conformation du CFTR. Elle serait impliquée dans l'ubiquitination et la dégradation précoce des précurseurs du CFTR-F508del (Farinha et Amaral, 2005). Un autre point de contrôle pouvant conduire à la mise en place du système ERAD est l'entrée des molécules CFTR immatures dans le « cycle de la calnexine » (pour revues : Helenius et Aebi, 2001, Helenius et Aebi, 2004) (**Figure 22**). Toujours selon Farinha et Amaral, il semblerait que seules les chaînes oligosaccharidiques monoglycosylées portées par les versions sauvages de la protéine CFTR puissent être reconnues par cette lectine (Farinha et Amaral, 2005).

La dégradation des molécules CFTR mal conformées par la voie ubiquitine-protéasome est la plus couramment décrite. Néanmoins, plusieurs travaux tendent à démontrer la participation d'autres voies de dégradation non protéosomales. Des inhibiteurs du protéasome, comme la lactacystine ou le MG-132, ralentissent la dégradation du CFTR mais ne semblent pas la bloquer entièrement (Jensen *et al.*, 1995, Ward *et al.*, 1995). En cohérence avec ces observations, Lukacs et collaborateurs avaient montré que la déplétion en ATP, molécule indispensable pour le fonctionnement du système ubiquitine-protéasome, n'impactait que légèrement la dégradation du CFTR (Lukacs *et al.*, 1994). Des travaux ont depuis confirmé ces observations et mis en évidence une voie de dégradation dépendante du GTP (guanosine triphosphate), au niveau du RE, pour les molécules CFTR-F508del mal conformées (De Keukeleire *et al.*, 2008). Enfin, l'existence d'un contrôle de qualité des protéines au niveau de la membrane plasmique pourra conduire à la dégradation des protéines CFTR-F508del non natives par une voie lysosomale (Okuyoneda *et al.*, 2010).

5.1.3. Le transport du CFTR entre le RE et l'appareil de Golgi

Classiquement, le transport de cargos (protéines circulantes dans le trafic vésiculaire) jusqu'au Golgi est réalisé par des vésicules COPII (*coat protein complex II*). Recouvertes du complexe

Sec23/Sec24, ces dernières bourgeonnent à partir de la membrane du RE (pour revue : Kirchhausen, 2000).

Bien que la prise en charge du CFTR par la machinerie du complexe COPII soit reconnue, il semblerait que cette dernière ne soit pas la seule impliquée. La reconnaissance du signal d'adressage di-acidique, localisé au niveau de la séquence ⁵⁶³YKDAD du NBD1, par le complexe Sec23/Sec24, est essentielle pour l'export du CFTR à partir du RE (Wang *et al.*, 2004). Par ailleurs, la possibilité d'un trafic non conventionnel des précurseurs a également été soulevée (Yoo *et al.*, 2002, Okiyonedo *et al.*, 2004b). En effet, leur maturation n'est pas impactée par des versions mutantes à effet dominant négatif des protéines Arf1, Rab1a, Rab2 (GTPases) et syntaxine 5, généralement engagées dans la voie de transport conventionnelle (Yoo *et al.*, 2002).

Un engagement des vésicules COPI (*coat protein complex I*) dans le transport antérograde et rétrograde du CFTR à travers les compartiments golgiens est aussi décrit (Yu *et al.*, 2007). En fonction du modèle d'étude utilisé, l'altération de la machinerie du complexe COPI affecte la maturation des protéines CFTR dans le Golgi et diminue les courants Cl⁻ activés par l'AMPc (Rennolds *et al.*, 2008).

5.2. La protéine CFTR dans les compartiments post-golgien et apical

La progression du CFTR dans la voie de sécrétion emprunte un trafic vésiculaire dans lequel il est déjà fonctionnel (Lukacs *et al.*, 1992). Une fois insérée dans la membrane plasmique, la protéine CFTR présente une grande mobilité. Près de 10 % du CFTR apical est internalisé chaque minute par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Prince *et al.*, 1994, Lukacs *et al.*, 1997). Toutefois, la stabilité apparente du canal à la surface cellulaire suggère un recyclage efficace de ce dernier, ceci dans le but de pallier sa biosynthèse peu efficace et de maintenir un transport ionique transépithélial adéquat.

Plusieurs protéines sont engagées dans le transport vésiculaire du CFTR mature. Un des composants majeur est le cytosquelette, à travers lequel circulent les vésicules, pouvant être accompagnées de GTPases de la famille Rab, de membres des protéines SNARE ou encore de représentants des protéines à domaine PDZ. De nombreux partenariats ont également été décrits pour moduler l'activité du canal CFTR à la surface cellulaire (**Figure 23**). À côté de partenaires tels que des transporteurs, des canaux ioniques, des récepteurs, des kinases, des phosphatases ou des éléments du cytosquelette, certaines protéines SNARE et PDZ jouent aussi un rôle important. En tant que molécules adaptatrices, les protéines PDZ permettent de lier indirectement le canal CFTR à plusieurs des partenaires listés ci-dessus (pour revue : Naren et Li, 2010).

5.2.1. Les protéines SNARE et les filamines : mobilisation de l'extrémité N-terminale

a. Les protéines SNARE

Ces protéines sont impliquées dans le transport intracellulaire, et notamment dans l'étape finale du trafic vésiculaire : la fusion membranaire. Ce processus fait intervenir deux groupes de protéines

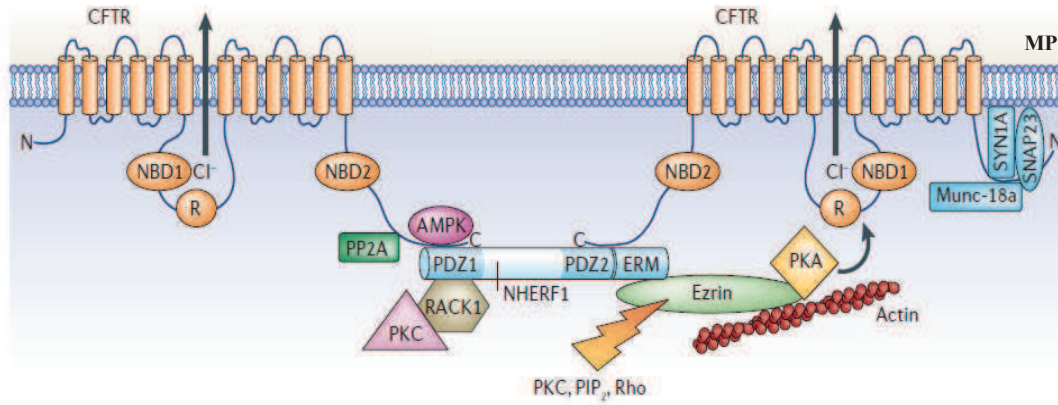


Figure 23 : Le CFTR et ses multiples partenaires dans le compartiment apical

La majorité des interactions protéine-protéine décrites dans le compartiment apical s'établit via les extrémités N- et C-terminales du CFTR. D'un côté, des associations directes avec la PP2A, l'AMPK ou encore la syntaxine 1A vont moduler négativement l'activité du canal et diminuer la sécrétion Cl⁻ dépendante du CFTR. De l'autre, l'interaction directe avec NHERF1 va améliorer la sécrétion ionique. En tant que protéine d'échafaudage, NHERF1 occupe une place essentielle dans le compartiment apical en assurant la mise en place de complexes macromoléculaires. Son domaine ERM va permettre le recrutement de l'ezrine, laquelle pourra par la suite lier la PKA. Cela va ancrer le CFTR dans le cytosquelette d'actine et favoriser la phosphorylation de son domaine R. De manière similaire, l'association entre RACK1 et NHERF1 permettra la régulation de l'activité du canal CFTR par la nPKCε.

AMP : adénosine monophosphate, AMPK : *AMP-activated protein kinase*, ATP : adénosine triphosphate, C : extrémité C-terminale, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, Cl⁻ : ion chlorure, domaine ERM : ezrine-radixine-moesine, kDa : kilodalton, MP : membrane plasmique, N : extrémité N-terminale, NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), NHERF1 : *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1*, PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, nPKCε : protéine kinase C nouvelle (isoforme epsilon), PKA : protéine kinase A, PP2A : protéine phosphatase 2A, R : domaine R, RACK1 : *receptor for activated C kinase*, SNAP-23 : *synaptosome-associated protein, 23 kDa*, SYN1A : syntaxine 1A

d'après la revue de Guggino et Stanton, 2006

SNARE : les v-SNARE (*vesicle associated-SNARE*) et les t-SNARE (*target membrane associated-SNARE*).

La syntaxine 1A est une protéine t-SNARE connue pour interagir physiquement et fonctionnellement avec l'extrémité N-terminale du CFTR (Naren *et al.*, 1997, Naren *et al.*, 1998, Peter *et al.*, 1999, Chang *et al.*, 2002). Au vu des propriétés connues des protéines SNARE, l'originalité de cette association vient du fait que cette syntaxine affecte directement l'activité du canal CFTR. Ceci s'explique par l'ancrage de cette protéine SNARE à la membrane apicale (**Figure 23**). L'expression de ces deux protéines dans des ovocytes de Xénope entraîne une diminution de la sécrétion Cl⁻ AMPc-dépendante. La liaison de la syntaxine 1A avec l'extrémité N-terminale du CFTR perturberait une interaction interdomaines essentielle avec le domaine R (Naren *et al.*, 1999). Le complexe syntaxine 1A/SNAP-23 (*synaptosome-associated protein, 23 kDa*) a également été engagé dans la modulation négative de l'activité du CFTR (Cormet-Boyaka *et al.*, 2002).

D'autres syntaxines sont, quant à elles, impliquées dans le trafic du CFTR. C'est le cas de la syntaxine 8 (Thoreau *et al.*, 1999, Bilan *et al.*, 2004), la syntaxine 3 (Collaco *et al.*, 2010), la syntaxine 6 (Cheng *et al.*, 2010) ou encore la syntaxine 16 (Gee *et al.*, 2010). Contrairement aux différentes protéines SNARE citées précédemment, la syntaxine 16 va réguler positivement la localisation apicale du canal CFTR. En interagissant avec l'extrémité N-terminale du CFTR, elle favoriserait son recyclage à partir des compartiments endosomaux (Gee *et al.*, 2010).

b. Les filamines

L'implication du cytosquelette d'actine dans la modulation de l'activité du CFTR est établie (Prat *et al.*, 1995, Prat *et al.*, 1999). Une connexion physique entre l'actine et le canal ionique a plusieurs fois été rapportée. Celle-ci peut s'établir de façon directe (Chasan *et al.*, 2002) ou être médiée par certaines protéines PDZ, telles que NHERF1, ou encore par des protéines associées à l'actine, comme les filamines.

Les filamines (FLNs) se présentent sous la forme d'un dimère capable de s'associer aux filaments d'actine. Elles sont engagées dans leur réticulation et participent, de ce fait, à l'organisation du réseau cortical sous-membranaire (Wang et Singer, 1977).

C'est en cherchant à caractériser fonctionnellement certaines mutations de l'extrémité N-terminale, que l'interaction entre le CFTR et la filamine-A (FLN-A) a été mise en évidence (Thelin *et al.*, 2007). La liaison de la FLN-A à la queue N-terminale du CFTR permet l'ancrage du canal inséré dans la membrane plasmique au réseau d'actine sous-jacent, le stabilisant à la surface cellulaire. En effet, lorsque cette interaction est perturbée (mutation S13F), le CFTR est rapidement internalisé puis acheminé vers les lysosomes où il est dégradé. Ces travaux soulignent ainsi l'engagement de l'extrémité N-terminale dans la stabilité apicale du canal CFTR (Thelin *et al.*, 2007).

Tableau III : Principales caractéristiques des protéines PDZ liant le CFTR

Protéines PDZ (autres noms)	Modules d'interaction	Localisation	Références (interaction CFTR)
NERHF1 (EBP50)	2 domaines PDZ 1 domaine ERM en C-ter	◦ expression ubiquitaire ◦ principalement localisée à la membrane apicale des cellules épithéliales	Short <i>et al.</i> , 1998
NHERF2 (E3KARP)	2 domaines PDZ 1 domaine ERM en C-ter	◦ expression ubiquitaire ◦ principalement localisée à la membrane apicale des cellules épithéliales	Sun <i>et al.</i> , 2000
PDZK1 (CAP70, NHERF3)	4 domaines PDZ	◦ exprimée dans l'intestin, le rein, le foie et le poumon ◦ principalement localisée à la membrane apicale des cellules épithéliales	Wang <i>et al.</i> , 2000b
PDZK2 (IKEPP, NHERF4)	4 domaines PDZ	◦ exprimée dans l'intestin et le rein ◦ principalement localisée à la membrane apicale des cellules épithéliales	Hegedus <i>et al.</i> , 2003
Shank2 (CortBP1)	1 domaine SH3 1 domaine PDZ 1 domaine <i>Pro-rich</i> 1 domaine SAM	◦ exprimée dans le cerveau (++), le rein (+), le foie (+), l'intestin (+) et le pancréas (+) ◦ principalement localisée à la membrane apicale des cellules épithéliales	Kim <i>et al.</i> , 2004 Lee <i>et al.</i> , 2007
CAL (GOPC)	2 domaines cc en N-ter 1 domaine PDZ en C-ter	◦ expression ubiquitaire ◦ principalement localisée dans la région péri-nuclaire, associée à l'appareil de Golgi (TGN)	Cheng <i>et al.</i> , 2002
GRASPs	2 domaines PDZ 1 domaine <i>Pro-rich</i>	◦ localisée dans la région péri-nuclaire, associée à l'appareil de Golgi et au RE	Gee <i>et al.</i> , 2011

→ protéines PDZ : signification des différents

NHERF1 et 2 : *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 et 2*, EBP50 : *erzin-radixin-moesin binding phosphoprotein-50*

E3KARP : *NHE3 kinase A regulatory protein*

PDZK1 : *PDZ domain-containing protein in kidney 1*, PDZK2 : *intestinal and kidney-enriched PDZ protein*

CAP70 : *CFTR-associated protein of 70 kDa*, IKEEP : *intestinal and kidney-enriched PDZ protein*

Shank2 : *Src homology 3 and ankyrin repeats-containing protein 2*, CortBP1 : *cortactin-binding protein 1*

CAL : *CFTR-associated ligand*, GOPC : *Golgi-associated PDZ and coiled-coil domain containing protein*

GRASPs : *Golgi reassembly and stacking proteins*

→ significations des autres

domaine cc : *coiled-coil*, domaine ERM : *erzine-radixine-moésine*, domaine *Pro-rich* : domaine riche en proline

domaine SAM : *sterile alpha motif*, domaine *SH3* : *Src-homology-3*

C-ter : C-terminal, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, kDa : kilodalton

N-ter : N-terminal, NHE3 : *Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3*, RE : réticulum endoplasmique, TGN : réseau *trans-* golgien (*trans-Golgi network*)

d'après la revue de Li et Naren, 2010

5.2.2. Les protéines à domaine PDZ : mobilisation de l'extrémité C-terminale

a. Généralités sur les domaines PDZ

Leur nom provient des trois premières protéines dans lesquelles ces domaines furent initialement identifiés : **PSD-95** (*postsynaptic density protein 95*), **Dlg** (*Drosophila junctional protein Disc-large*) et **ZO-1** (*zonula occludens 1*). Ces domaines représentent les modules d'interaction protéine-protéine les plus communément rencontrés dans le génome humain. Ils sont composés d'environ 80 à 90 résidus, qui présentent la propriété de lier de courtes séquences d'acides aminés (motif PDZ). Ces séquences sont généralement retrouvées dans l'extrémité C-terminale des protéines cibles (pour revues : Fanning et Anderson, 1999, Harris et Lim., 2001, Hung et Sheng, 2002, Li et Naren, 2010). Les protéines possédant ce type de domaine sont qualifiées de protéines PDZ ou encore de protéines d'échafaudage PDZ.

Les domaines PDZ sont classés en fonction de la séquence d'acides aminés qu'ils ciblent. Ceux de classe I reconnaissent la séquence -X-(S/T)-X- ϕ , où X représente un acide aminé quelconque et ϕ un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe (pour revues : Harris et Lim, 2001, Hung et Sheng, 2002). L'extrémité C-terminale de la protéine CFTR humaine présente la séquence ¹⁴⁷⁷DTRL¹⁴⁸⁰ (Asp-Thr-Arg-Leu) et est ainsi reconnue par de nombreuses protéines PDZ (pour revue : Li et Naren, 2010).

Ces protéines contiennent souvent, en plus d'un ou plusieurs domaines PDZ, d'autres types de modules d'interaction tels qu'un domaine SH3 (*Src homology*), une région riche en proline (*Pro-rich*), un domaine SAM (*sterile alpha motif*), un domaine cc (*coiled coil*) ou encore un domaine ERM (erzine-radixine-moésine). Ce dernier permet l'association des protéines PDZ avec les protéines MERM (merline-erzine-radixine-moésine), protéines de liaison à l'actine. Ceci favorise des relations physiques entre les protéines PDZ et le cytosquelette cortical d'actine (Reczek et Bretscher, 1998). En tant que membre de la famille des AKAPs (*A-kinase anchoring proteins*), l'erzine est également capable de lier les sous-unités régulatrices de la PKA (Dransfield *et al.*, 1997), et donc d'induire sa séquestration subcellulaire.

Au moins sept protéines contenant des domaines PDZ ont été identifiées comme partenaires directs de la protéine CFTR. Il s'agit des protéines NHERF1, NHERF2, PDZK1 (*PDZ domain-containing protein in kidney 1*), PDZK2 (*intestinal and kidney-enriched PDZ protein*), Shank2 (*Src homology 3 and ankyrin repeats-containing protein 2*) et CAL (*CFTR-associated ligand*) (pour revue : Li et Naren, 2010). Plus récemment, des membres de la famille GRASP (*Golgi reassembly stacking protein*) ont été rajoutés à cette liste (Gee *et al.*, 2011). Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le **Tableau III**.

Pour la suite de la discussion, seuls seront abordés les cas des NHERFs, de CAL et des GRASPs.

b. CFTR et les NHERFs (NHERF1 et NHERF2)

Rapidement après la découverte de l'association entre NHERF1 et le CFTR, il a été proposé qu'elle influençait la stabilité apicale et l'activité du canal chlorure. Ceci s'expliquerait par la mise en

place d'une interaction indirecte entre le CFTR et le cytosquelette d'actine sous-membranaire, via le domaine ERM de NHERF1 (Short *et al.*, 1998).

L'implication du motif PDZ du CFTR et de certaines protéines PDZ dans la localisation apicale du canal a fait l'objet de nombreux travaux aux conclusions divergentes. Le motif PDZ et les protéines PDZ comme NHERF1 joueraient un rôle clé dans la polarisation apicale du canal (Moyer *et al.*, 1999). Par ailleurs, une corrélation entre l'association NHERF1/CFTR et les sécrétions ioniques AMPc-dépendantes a été observée (Moyer *et al.*, 2000). En parallèle de cela, des travaux suggèrent que ce motif PDZ constitue un signal de rétention dans la membrane apicale et engagent certaines protéines PDZ dans le contrôle du recyclage de la protéine CFTR (Swiatecka-Urban *et al.*, 2002).

Néanmoins, la pertinence physiologique de la liaison de NHERF1 au CFTR pour une expression fonctionnelle du canal à la surface cellulaire est quelque peu remise en question (Benharouga *et al.*, 2003, Ostedgaard *et al.*, 2003). En effet, des patients porteurs de la mutation S1455X ou de la délétion CFTR-del26 présentent une sueur modérément salée mais pas de dysfonctionnement pancréatique et pulmonaire évident (Mickle *et al.*, 1998). Bien que confirmant la capacité de NHERF1 à stimuler les courants Cl⁻ AMPc-dépendants, les groupes de G.L Lukacs et de M.J Welsh proposent que d'autres signaux, en plus du motif PDZ et des 26 derniers résidus de l'extrémité C-terminale, sont requis pour la localisation apicale du CFTR dans les épithélia différenciés (Benharouga *et al.*, 2003, Ostedgaard *et al.*, 2003).

Plusieurs travaux continuent toutefois de rapporter l'engagement de NHERF1 dans la localisation, la stabilité apicale et l'activité de la protéine CFTR (Guerra *et al.*, 2005, Bossard *et al.*, 2007, Kwon *et al.*, 2007). Par ailleurs, la surexpression de NHERF1 induit une redistribution significative du CFTR-F508del du cytosol vers la membrane apicale et la restauration d'une conductance Cl⁻ activée par la PKA (Guerra *et al.*, 2005, Bossard *et al.*, 2007, Fanelli *et al.*, 2008). Ces observations ont par la suite été précisées dans le modèle d'étude CFBE41o-. Cette lignée est issue d'un épithélium bronchique humain homozygote pour la mutation F508del. En induisant la formation du complexe multiprotéique NHERF1/RhoA/erzine/actine, la surexpression de NHERF1 promeut la réorganisation du cytosquelette d'actine. Par son interaction avec la protéine PDZ, le CFTR-F508del va pouvoir y être ancré. Sa stabilisation dans la membrane apicale serait à l'origine de la restauration des transports d'ions Cl⁻ (Favia *et al.*, 2010).

La formation du complexe CFTR/NHERF1/erzine/actine apparaît donc essentielle pour une expression fonctionnelle stable du CFTR dans la membrane apicale. Celui-ci va en effet favoriser le transport antérograde du CFTR et sa stabilité dans la membrane plasmique. De plus, en tant que membres de la famille des AKAPs, l'erzine va également permettre d'associer la PKA à ce complexe. Cela va favoriser son rapprochement avec le domaine R du CFTR et une phosphorylation efficace du canal.

D'autres exemples permettent d'illustrer la fonction d'échafaudage assurée par les protéines NHERFs et leur engagement dans la mise en place de complexes de signalisation macromoléculaires apicaux. L'organisation de ces complexes de régulation à la surface apicale (ou basolatérale) des

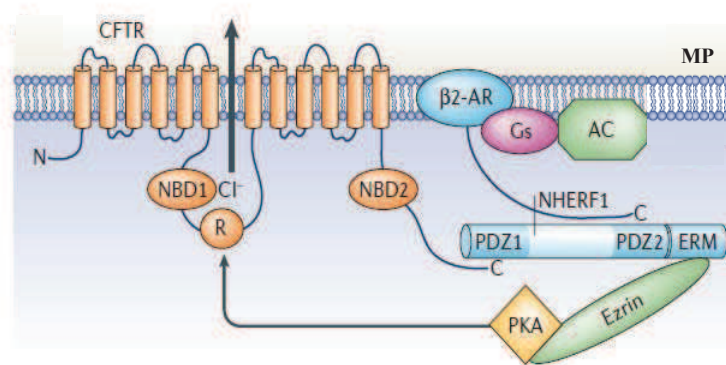


Figure 24 : Modulation de l'activité du canal CFTR par le complexe de signalisation macromoléculaire CFTR/NHERF1/β2-AR

AC : adénylate cyclase, ATP : adénosine triphosphate, β2-AR : récepteur β2-adrénergique (*β2-adrenergic receptor*), C : extrémité C-terminale, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, Cl⁻ : ion chlorure, domaine ERM : ezrine-radixine-moésine, Gs : protéine G (sous-unité αs), MP : membrane plasmique, N : extrémité N-terminale, NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domains*), NHERF1 : *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1*, PKA : protéine kinase A, R : domaine régulateur

adaptée de la revue de Guggino et Stanton, 2006

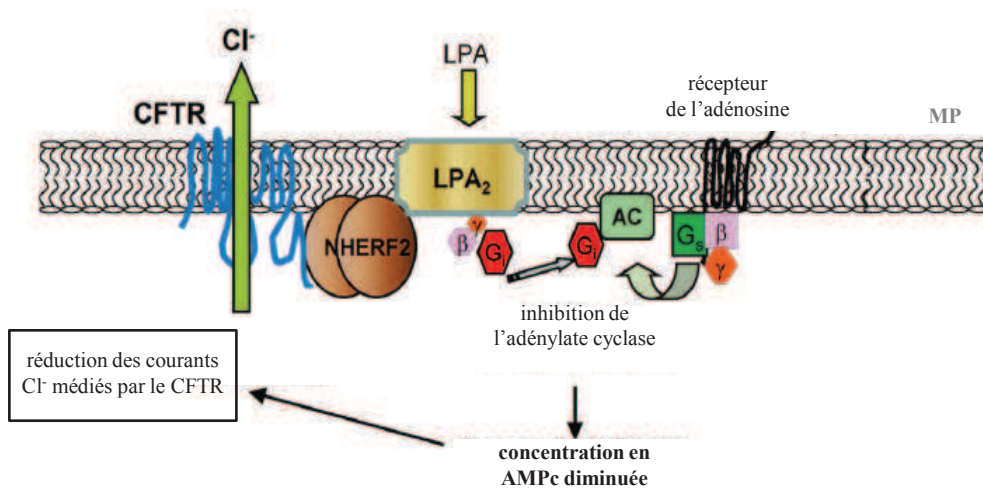


Figure 25 : Modulation de l'activité du canal CFTR par le complexe de signalisation macromoléculaire CFTR/NHERF2/LPA₂

AC : adénylate cyclase, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, Cl⁻ : ion chlorure, Gs et Gi : protéines G (sous-unités αs et αi), LPAs: acides lysophosphatidiques, LPA₂ : récepteur des LPAs, MP : membrane plasmique, NHERF2 : *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 2*

adaptée de la revue de Li et Naren, 2010

cellules épithéliales assure une compartimentation des différents acteurs requis pour une signalisation efficace. Il s'agira ici d'en développer deux exemples.

- Modulation de l'activité du CFTR par le complexe CFTR/NHERF1/ β 2-AR

Le récepteur β 2-adrénérique (β 2-AR) est l'isoforme majeure exprimée dans les cellules épithéliales des voies aériennes. Sa stimulation, *in vivo*, par un agoniste (isoprotérénol) conduit à l'activation du transport des ions Cl^- assuré par le canal CFTR (Walker *et al.*, 1997). Ce récepteur possède un motif PDZ, qui permet la formation du complexe CFTR/NHERF1/ β 2-AR à la surface apicale des cellules épithéliales respiratoires (Naren *et al.*, 2003).

Un modèle a été proposé pour illustrer le couplage de la signalisation associée au β 2-AR à l'activité du canal CFTR (**Figure 24**). Selon ce modèle, des molécules de signalisation viennent compléter le complexe CFTR/NHERF1/ β 2-AR. En présence d'un agoniste, l'activation de la voie de signalisation associée au β 2-AR entraîne la stimulation de l'AC, conduisant à une augmentation de la concentration locale en AMPc. Ce second messenger pourra activer la PKA, qui, associée à l'enzyme, est localisée à proximité du domaine R du CFTR, favorisant sa phosphorylation rapide et son ouverture. Cet exemple souligne l'importance de la compartimentation de la signalisation pour une transduction rapide et efficace du signal du β 2-AR vers le canal CFTR (Naren *et al.*, 2003).

- Modulation de l'activité du CFTR par le complexe CFTR/NHERF2/LPA₂

Les acides lysophosphatidiques (LPAs) sont des dérivés de phospholipides. Ils sont présents dans divers liquides biologiques (sang, liquide d'ascite) et aliments (pour revue : Mills et Moolenaar, 2003). Les LPAs exercent leurs effets via la liaison à des RCPG, parmi lesquels LPA₂ est unique. Son extrémité C-terminale est la seule à posséder un motif PDZ (séquence DSTL) pour lequel une interaction avec NHERF2 est connue. De plus, LPA₂ présente une distribution cellulaire similaire au CFTR. En effet, il a été identifié dans la membrane apicale de cellules épithéliales des voies digestives (Li *et al.*, 2005) et respiratoires (Zhang *et al.*, 2011).

La formation du complexe CFTR/NHERF2/LPA₂ à la membrane plasmique de cellules épithéliales intestinales conduit au couplage fonctionnel de la signalisation du LPA₂ à la sécrétion Cl^- AMPc-dépendante (Li *et al.*, 2005) (**Figure 25**). Selon le modèle proposé, l'interaction entre LPA et LPA₂ active la voie de signalisation liée à la sous-unité $\text{G}\alpha_i$. L'inhibition de l'AC induit une diminution de la concentration locale en AMPc dans l'environnement proche du CFTR. La baisse de l'activation de la PKA qui s'en suit entraîne une réduction de la phosphorylation du CFTR (Li *et al.*, 2005).

De nombreuses observations soutiennent l'importance de la compartimentation sous-apicale de l'AMPc et de la PKA avec le CFTR, pour une action efficace de l'enzyme et une activation optimale du canal. La localisation subapicale d'un niveau suffisant d'AMPc nécessaire à l'activation de la PKA dépendrait également de l'intégrité du cytosquelette d'actine. La stabilisation fonctionnelle observée dans les cellules CFBE41o- suite à la surexpression de NHERF1 s'expliquerait non seulement, par la réorganisation du cytosquelette d'actine mais également, par la restauration d'une compartimentation subcorticale de l'AMPc (Monterisi *et al.*, 2012). Ces travaux soulignent aussi que la présence du

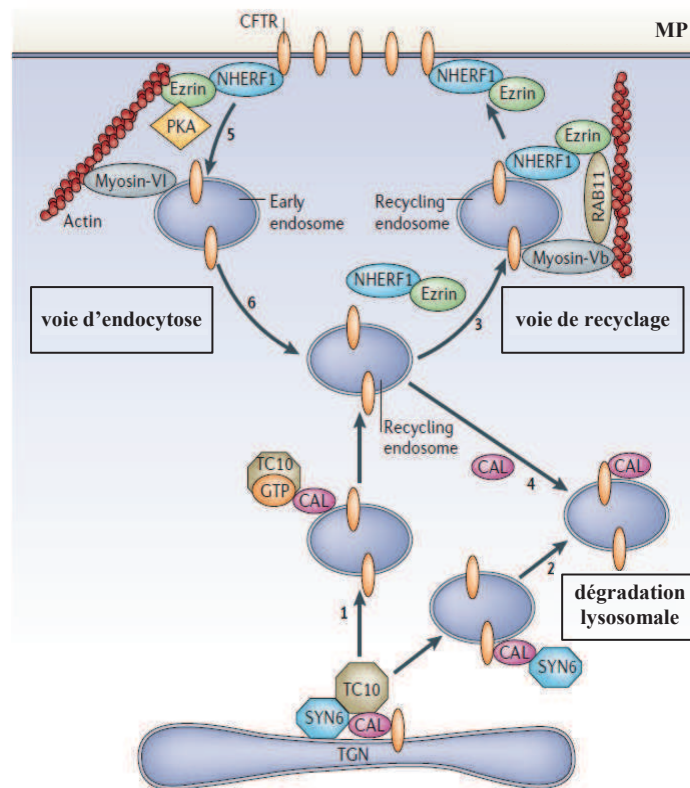


Figure 26 : De multiples partenaires impliqués dans le transport post-golgien du CFTR

En tant que partenaires directs, certaines protéines PDZ vont jouer un rôle essentiel dans le devenir de la protéine CFTR dans les étapes distales sa voie de sécrétion. Ce schéma illustre la fonction d'échafaudage assurée par les protéines NHERF1 et CAL qui, en fonction des complexes protéiques mis en place, seront capables de stabiliser le canal dans la membrane plasmique, de favoriser son recyclage à la surface cellulaire ou encore de le diriger vers la voie de dégradation lysosomale.

- 1- complexe CFTR/CAL/TC10 : favorise l'entrée du CFTR dans la voie d'exocytose et ainsi son insertion dans la membrane apicale [via le complexe NHERF1/ezrine (3)]
- 2- complexe CFTR/CAL/SYN6 : dirige la protéine mature du réseau *trans*-golgien vers les lysosomes
- 3- compétition entre le complexe NHERF1/ezrine et CAL pour l'interaction avec le CFTR : si NHERF1 déplace CAL alors les endosomes renfermant la protéine CFTR sont adressés à la membrane plasmique (ce processus est facilité par la myosine Vb et la protéine Rab11)
- 4- liaison CFTR/CAL : conduit le CFTR des endosomes vers les lysosomes
- 5- complexe CFTR/NHERF1/ezrine/actine : stabilise le CFTR à la surface apicale (ancrage au cytosquelette d'actine grâce au domaine ERM de NHERF1)
- 6- dissociation CFTR/NHERF1 : entraîne l'internalisation du canal CFTR via un processus clathrine-dépendant engageant, entre autres, le complexe AP-2 mais aussi la myosine VI (cf. **Figure 28**)

AP-2 : *adaptor protein complex 2*, CAL : *CFTR-associated ligand*, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, domaine ERM : *ezrine-radixine-moesine*, GTP : *guanosine triphosphate*, MP : *membrane plasmique*, NHERF1 : *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1*, PKA : *protéine kinase A*, SYN6 : *syntaxine 6*, TGN : *trans-Golgi network*

adaptée de la revue de Guggino et Stanton, 2006

CFTR à la membrane plasmique influence le niveau organisationnel du cytosquelette et, par conséquent, la distribution de l'AMPc (Monterisi *et al.*, 2012).

c. CFTR et CAL

Associée à l'appareil de Golgi, cette protéine présente un domaine PDZ et deux domaines *coiled coil* en N-terminal. Ces derniers sont impliqués dans son interaction avec la protéine TC10 (Neudauer *et al.*, 2001) et la syntaxine 6 (Charest *et al.*, 2001), suggérant l'engagement de CAL dans le transport vésiculaire (post-golgien).

Le groupe de W.B. Guggino fut le premier à rapporter une interaction directe entre le CFTR et cette protéine PDZ (Cheng *et al.*, 2002). Plusieurs observations ont été faites au cours de cette étude : i) la co-transfection de CAL avec le CFTR diminue les courants Cl^- médiés par le CFTR, ii) la baisse de la sécrétion Cl^- est corrélée avec une baisse de l'expression du CFTR à la surface cellulaire, iii) la surexpression de CAL réduit l'adressage du CFTR mature à la membrane [trafic TGN (*trans-Golgi network*) → membrane plasmique] et enfin iv) l'effet inhibiteur de CAL est contrecarré par la surexpression de NHERF1, qui bloque l'association entre CAL et l'extrémité C-terminale du CFTR (probablement dans les endosomes de recyclage et par un mécanisme de compétition pour le motif PDZ du CFTR) (Cheng *et al.*, 2002) (**Figure 26**). En effet, l'affinité du domaine PDZ de CAL pour le motif PDZ du CFTR serait bien plus faible que celle des domaines PDZ des protéines NHERF1 et NHERF2 (Cushing *et al.*, 2008). En complément, Cheng et collaborateurs ont par la suite proposé un modèle selon lequel CAL favorisait la dégradation lysosomale du CFTR entièrement glycosylé (à la sortie du TGN) et du canal inséré dans la membrane plasmique, sans néanmoins affecter son processus de maturation (Cheng *et al.*, 2004). Par ailleurs, via son association physique avec CAL, la petite GTPase TC10 activée (liée au GTP) serait capable de détourner le CFTR de la voie de dégradation lysosomale et de le diriger vers la membrane plasmique (Cheng *et al.*, 2005) (**Figure 26**). Enfin, plus récemment, la syntaxine 6 a été identifiée comme nouveau composant du complexe CAL. Contrairement à TC10, cette syntaxine dirige la protéine CFTR mature du TGN vers la voie de dégradation lysosomale (Cheng *et al.*, 2010). Ainsi, en tant que partenaire direct du CFTR, CAL servirait de molécule adaptatrice, permettant la mise en place d'une régulation indirecte du transport intracellulaire du CFTR par les protéines TC10 et syntaxine 6 (**Figure 26**).

Au vu de ces différentes observations, CAL pourrait alors représenter une cible thérapeutique intéressante pour la correction des défauts de transport post-golgien dans la mucoviscidose. À titre d'exemple, une stratégie d'ARN interférence, ciblant l'expression de la protéine CAL endogène dans des cellules épithéliales bronchiques humaines CF, a conduit à une hausse spécifique de l'expression de la protéine CFTR-F508del à la surface cellulaire, augmentant les courants Cl^- transépithéliaux (Wolde *et al.*, 2007).

d. CFTR et les GRASPs

Le rôle physiologique des GRASPs n'est pas encore totalement établi. Bien qu'initialement identifiées comme des protéines associées à l'appareil de Golgi (Barr *et al.*, 1997), il s'avère qu'elles

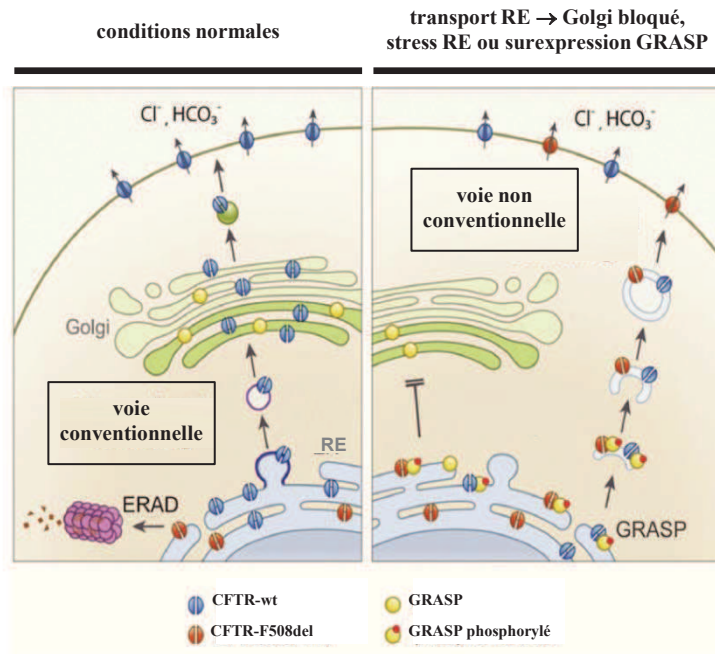


Figure 27 : Adressage apical du CFTR par la voie non conventionnelle dépendante des GRASPs

Sous certaines conditions, le transport intracellulaire de la protéine CFTR (sauvage et F508del) pourra emprunter une voie de sécrétion non conventionnelle puisqu'indépendante de l'appareil de Golgi. Cette voie dépendante des GRASPs conduit à la présence dans la membrane plasmique de canaux CFTR partiellement glycosylés mais fonctionnels.

CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, Cl^- : ion chlorure, ERAD : *endoplasmic reticulum-associated degradation*, GRASP : *Golgi reassembly stacking protein*, HCO_3^- : ion bicarbonate, RE : réticulum endoplasmique, wt : sauvage (*wild-type*)

adaptée de Gee et al., 2011

ne sont pas indispensables au transport antérograde conventionnel des protéines (Schotman *et al.*, 2008). Des travaux menés chez des modèles invertébrés rapportent que les GRASPs sont impliquées dans une voie de sécrétion non conventionnelle des protéines, laquelle est indépendante de l'appareil de Golgi (Kinseth *et al.*, 2007, Schotman *et al.*, 2008).

Bien qu'il soit communément accepté que la forme mature du CFTR soit l'unique forme exprimée dans la membrane plasmique, il semble que le CFTR puisse également atteindre la surface cellulaire sous une forme partiellement glycosylée (Kwon *et al.*, 2007, Rennolds *et al.*, 2008, Luo *et al.*, 2009). Ces observations suggèreraient que le CFTR ait été adressé à la surface apicale sans un passage préalable par l'appareil de Golgi. Une étude conduite en 2011 par le groupe de M.G. Lee a permis de lever le voile sur les acteurs et les mécanismes moléculaires engagés dans cette voie de sécrétion non conventionnelle du CFTR (Gee *et al.*, 2011). Ce processus se mettrait en place sous certaines conditions et engagerait des représentants des GRASPs. L'adressage à la membrane du CFTR partiellement glycosylé requiert une interaction physique entre GRASP55 et le CFTR et la phosphorylation de GRASP55. Selon le modèle proposé (**Figure 27**), le déclenchement de l'UPR (stress du RE), et notamment l'activation de la branche IRE1, va induire la phosphorylation de GRASP nécessaire pour son association avec le CFTR (wt et muté F508del). Ce dernier est par la suite transporté à la membrane plasmique sans passer par l'appareil de Golgi, où, même partiellement glycosylé, il assure sa fonction de canal ionique (Gee *et al.*, 2011).

Cette voie de sécrétion non conventionnelle dépendante des GRASPs a également été observée *in vivo*. Des modèles murins homozygotes pour la mutation F508del et manipulés génétiquement afin de permettre une surexpression de la protéine GRASP55 (souris TgGRASP55) montrent, au niveau de l'épithélium du côlon, une restauration des courants Cl⁻ dépendants du CFTR. Des expérimentations de biotinylation, conduites sur des échantillons de muqueuse intestinale de ces mêmes souris, permettent de corréliser ces observations fonctionnelles avec une expression du CFTR-F508del partiellement glycosylé à la surface cellulaire (Gee *et al.*, 2011).

De multiples protéines PDZ sont donc capables de cibler le CFTR. À travers les différentes études mentionnées ci-dessus, il apparaît que de telles interactions peuvent influencer : i) la quantité de canaux CFTR fonctionnels à la membrane apicale des cellules épithéliales, ii) l'activité du canal CFTR ou bien iii) les deux à la fois. Cependant, malgré le nombre croissant de travaux à ce sujet, il reste encore de nombreux points à éclaircir, comme les mécanismes qui sous-tendent ces effets ou encore la mesure dans laquelle ces interactions impactent l'activité du CFTR *in vivo*. Bien que quelques études commencent à être mises en place chez le modèle animal, de nombreuses données manquent sur la pertinence physiologique de ces associations protéine-protéine.

5.2.3. Autres protéines impliquées dans le trafic apical de la protéine CFTR

a. Protéines accompagnant le CFTR pendant son endocytose clathrine-dépendante

La création de protéines chimériques, composées du récepteur de la transferrine dépourvu de son extrémité N-terminale mais arborant des portions des régions N- et C-terminales de la protéine

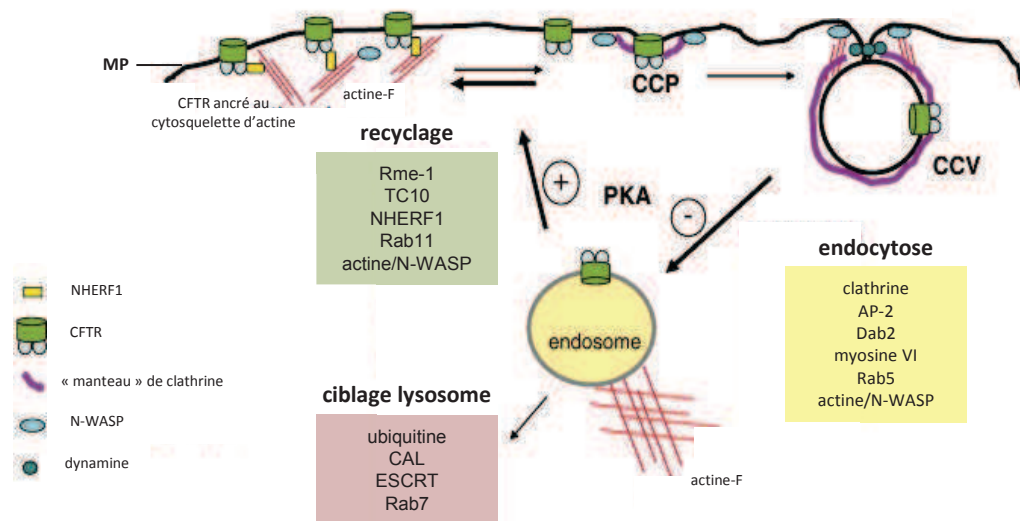


Figure 28 : Représentation schématique du trafic apical de la protéine CFTR

De nombreuses protéines sont impliquées dans le transport apical du canal CFTR, qui comprend l'endocytose dépendante de la clathrine, le recyclage, et la dégradation lysosomale. Sont retrouvées, entre autres, certaines protéines PDZ (NHERF1, CAL), des membres de la famille des GTPases Rab (Rab 5, 7 et 11), des protéines adaptatrices (AP-2), la GTPase TC10, la protéine Rme-1 ou encore la myosine VI et la protéine Dab2.

AP-2 : *adaptor protein complex 2*, CAL : *CFTR-associated ligand*, CCP : puit recouvert de clathrine (*clathrin-coated pit*), CCV : vésicule recouverte de clathrine (*clathrin-coated vesicle*), CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance*, Dab2 : *Disabled-2*, ESCRT : *endosomal sorting complexes required for transport*, MP : membrane plasmique, NHERF1 : *Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1*, N-WASP : *neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*, PKA : protéine kinase A

adaptée de la revue de Okiyoneda et Lukacs, 2007

CFTR, démontre que ces dernières suffisent pour induire une internalisation efficace des chimères (Prince *et al.*, 1999). Ces travaux ont également permis d'identifier la séquence ¹⁴²⁴YDSI (dépendante d'une tyrosine, Y) comme un signal d'endocytose du CFTR (Prince *et al.*, 1999). D'autres motifs d'internalisation (di-leucine et tyrosine), également localisés dans la région C-terminale du CFTR, ont par la suite été décrits (Hu *et al.*, 2001). Le processus endocytique du CFTR repose sur la reconnaissance de ce motif par la sous-unité mu2 du complexe AP-2 (*adaptor protein complex 2*), lequel est impliqué dans la formation des manteaux de clathrine. La perturbation de l'association entre ces deux entités, par la surexpression d'une forme mutante de la sous-unité mu2, réduit l'internalisation du canal d'environ 60 % (Weixel et Bradbury, 2000, Weixel et Bradbury, 2001a,b). Bien qu'encore discuté, l'interaction entre le complexe AP-2 et l'extrémité C-terminale du CFTR faciliterait l'entrée du canal dans les vésicules recouvertes de clathrine (CCV, *clathrin-coated vesicles*) (Weixel et Bradbury, 2000, Cihil *et al.*, 2012).

Un autre acteur indispensable à cette voie d'endocytose dépendante de la clathrine est la dynamine, qui assure l'étape de fission des vésicules. Une internalisation efficace du CFTR repose également sur la polymérisation de l'actine, laquelle engage N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*) (Ganeshan *et al.*, 2007) qui intervient dans l'organisation de l'actine corticale (pour revue : Millard *et al.*, 2004). La myosine VI, protéine associée aux filaments d'actine et qui se déplace vers leur extrémité pointue, compte aussi parmi les acteurs de ce processus. En effet, la présence d'une myosine VI non fonctionnelle conduit à une diminution de l'endocytose du CFTR (Swiatecka-Urban *et al.*, 2004). En s'associant à cette myosine, la protéine Dab2 (*Disabled-2*) participerait également à l'internalisation du CFTR (Swiatecka-Urban *et al.*, 2004). Plus récemment, Fu et collaborateurs ont confirmé le rôle de Dab2 dans l'endocytose du canal et précisé qu'elle serait aussi impliquée dans le devenir post-endocytique du CFTR internalisé (Fu *et al.*, 2012). Enfin, l'implication d'un membre de la famille des GTPases Rab a été démontrée. D'un côté, la surexpression de Rab5 favorise la redistribution de la protéine CFTR depuis la surface membranaire vers les endosomes sous-apicaux. De l'autre, la surexpression d'une version mutante à effet dominant négatif de Rab5 perturbe l'endocytose clathrine-dépendante du canal (Gentzsch *et al.*, 2004) (**Figure 28**).

b. Protéines accompagnant le CFTR au cours de son recyclage à la surface cellulaire

Suite à la fusion de la vésicule de clathrine avec un endosome précoce, les canaux CFTR internalisés pourront être dirigés vers la voie de dégradation lysosomale ou être recyclés à la surface cellulaire, par l'intermédiaire des endosomes de recyclage.

De nombreuses protéines sont engagées aux côtés de NHERF1 dans la voie de recyclage du CFTR (**Figure 28**). C'est notamment le cas de Rme-1, protéine décrite comme favorisant la sortie des molécules CFTR des ERCs (*endosomal recycling compartments*), par lesquels transitent les canaux CFTR internalisés destinés à être recyclés vers la surface cellulaire (Picciano *et al.*, 2003). Alors que l'endocytose du CFTR n'est nullement impactée par l'expression d'une version mutante à effet dominant négatif de Rme-1, celle-ci perturbe fortement le recyclage du CFTR internalisé (Picciano *et al.*, 2003). La GTPase Rab11 (Gentzsch *et al.*, 2004, Silvis *et al.*, 2009) et N-WASP (Ganeshan *et al.*, 2007) sont également impliquées dans la redistribution du CFTR vers la surface cellulaire. Enfin, alors

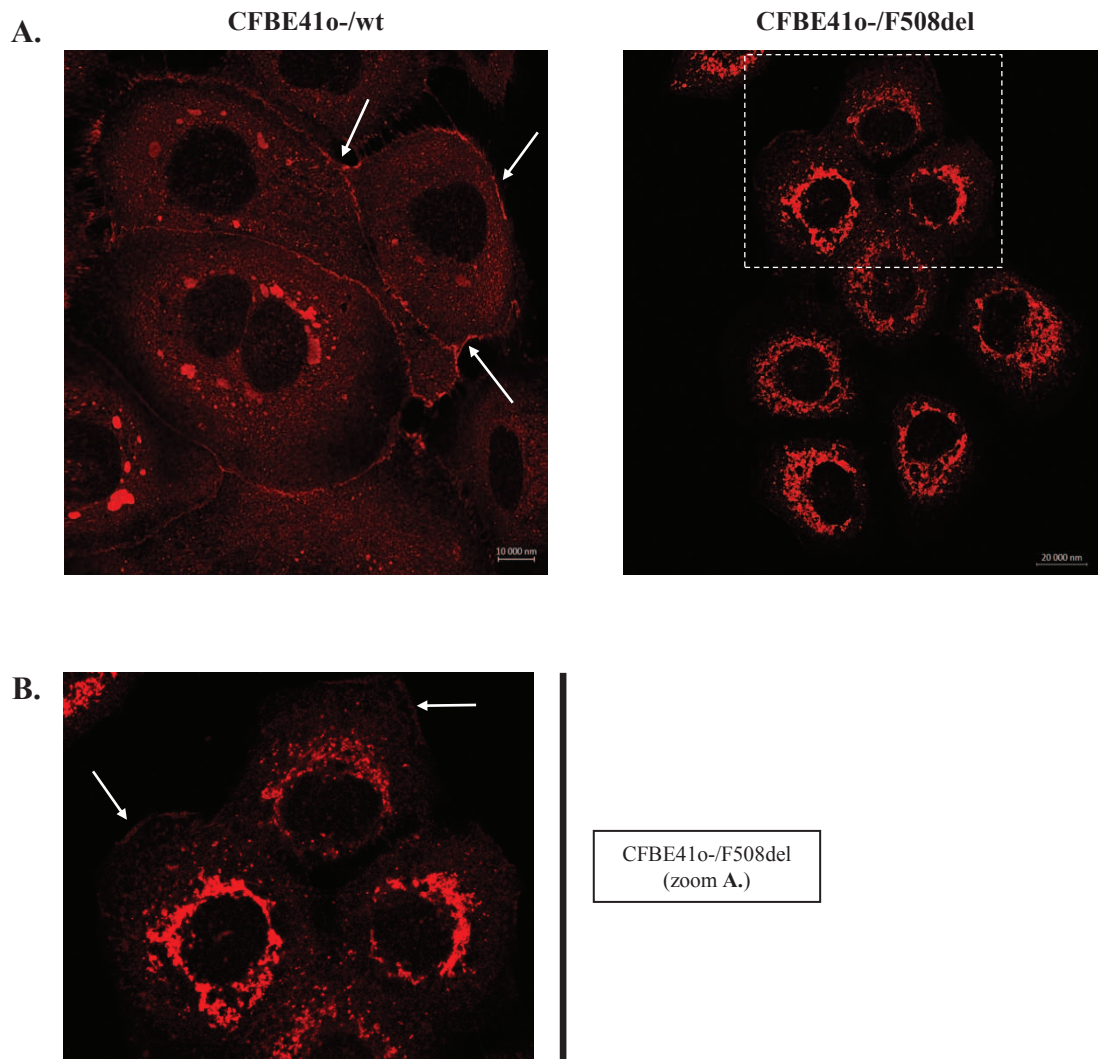


Figure 29 (A-B): Localisation du CFTR dans les lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines CFBE41o-/wt et CFBE41o-/F508del

A. Observation en microscopie confocale de la protéine CFTR (rouge) dans les lignées CFBE41o-/wt et CFBE41o-/F508del (images représentatives). Les cellules CFBE41o-/wt présentent un marquage sous forme de liseré, plus ou moins continu, à la membrane plasmique, lequel correspond au canal CFTR présent à la surface cellulaire (flèches blanches). Les cellules CFBE41o-/F508del montrent, quant à elles, un marquage plus accentué dans la région péri-nucléaire. Néanmoins, pour certaines d'entre elles, un fin liseré (plutôt non continu) peut également être observé à la membrane plasmique (**B.**).

Des contrôles, pour lesquels l'anticorps dirigé contre le CFTR a été omis, ont également été réalisés (non montrés ici).

→ conditions de marquage (CFTR) : Ac I^{aires} (clone 24-1, 1/50^e) : incubation sur la nuit à 4°C, Ac II^{aires} (Cy3, 1/400^e) : incubation de 60 min à température ambiante

→ appareillage, conditions d'observation : LSM 780, Axio Observer (Carl Zeiss GmbH), Plan-Apochromat 63X/1.40 oil (immersion)

→ logiciel d'exploitation : Zen 2011, blue edition

Ac : anticorps, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, min : minute, wt : sauvage (*wild-type*)

marquages réalisés au sein de l'Inserm UMR 1078, Brest (N.Benz)

qu'elle présente un effet inhibiteur sur l'internalisation du canal CFTR, la PKA favorise le transport vésiculaire du CFTR internalisé des endosomes vers la membrane cellulaire (pour revue : Okiyoned et Lukcas, 2007).

6. Les conséquences engendrées par la mutation F508del sur la protéine CFTR

La délétion des trois nucléotides codant la phénylalanine localisée en position 508 de la protéine CFTR est la mutation majoritairement retrouvée chez les personnes atteintes de formes classiques de mucoviscidose. Près de 90 % des malades présentent au moins un allèle porteur de cette anomalie moléculaire (pour revue : Riordan, 2008), ce qui en fait une cible de choix pour la recherche thérapeutique.

Cette mutation de **classe II**, portée par NBD1, n'affecte ni la liaison à l'ATP ni le cadre de lecture mais perturbe fortement le processus d'assemblage de la protéine CFTR dans le RE. Incapable d'acquérir une conformation correcte, la protéine mutée y est retenue par les nombreux acteurs de la machinerie du contrôle de qualité (ERQC) et est rapidement dirigée vers la voie ubiquitine-protéasome. La perte du résidu F508 empêche donc la maturation complète de la protéine dans l'appareil de Golgi et son transport vers la surface cellulaire. Par ailleurs, lorsque les canaux mutés sont restaurés de manière artificielle à la membrane plasmique, de même que le faible pourcentage l'atteignant naturellement, leur comportement diffère de celui des canaux sauvages, que ce soit en termes de fonctionnalité (Dalemans *et al.*, 1991, Haws *et al.*, 1996, Hwang *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2000a) ou de stabilité (Lukacs *et al.*, 1993, Heda *et al.*, 2001, Sharma *et al.*, 2004, Swiatecka-Urban *et al.*, 2005).

6.1. Localisation cellulaire de la protéine CFTR-F508del

Contrairement au CFTR-wt, le CFTR-F508del n'acquiert pas la résistance à l'endoglycosidase H, caractéristique de la forme mature de la protéine (Cheng *et al.*, 1990). Ces données suggèrent que la protéine mutée est retenue dans le RE et que sa progression vers le compartiment golgien est limitée (**Figure 29**). Cela se traduit par l'observation d'une seule bande aux alentours de 145 kDa (**bande B**) lors d'immunodétections par Western blot.

Dès le début des années 1990, il est rapporté qu'à la différence du CFTR-wt, le CFTR-F508del montre une accumulation dans la région péri-nucléaire. Cela a été observé dans les glandes sudoripares (Cohn *et al.*, 1991, Kartner *et al.*, 1992), les glandes sous-muqueuses bronchiques (Engelhardt *et al.*, 1992) et l'épithélium de surface des voies aériennes hautes (épithélium nasal) (Puchelle *et al.*, 1992). Ces observations ont été corrélées avec des études fonctionnelles, montrant une sécrétion Cl⁻ AMPc-dépendante défectueuse dans des épithélia respiratoires et intestinaux (rectum) issus de patients CF (Boucher *et al.*, 1989, Veeze *et al.*, 1991). Par la suite, divers travaux ont confirmé ces constatations en accord avec le concept selon lequel la mutation F508del perturbe le processus de biosynthèse de la protéine CFTR et son adressage à la surface cellulaire. Dans les épithélia CF, sa rétention dans le RE et sa dégradation excessive conduisent à un transport

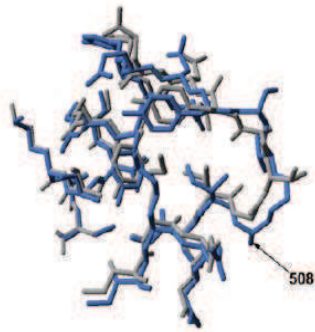
électrolytique dépendant du CFTR considérablement réduit (Dormer *et al.*, 2001, Mall *et al.*, 2004, Kreda *et al.*, 2005).

Il existe toutefois quelques données contradictoires concernant l'expression de la protéine CFTR-F508del dans les divers tissus touchés (niveau d'expression et localisation). Lors d'expériences d'immunohistochimie et de biochimie conduites à partir de tissus épithéliaux du tractus respiratoire (surface et glandes sous-muqueuses) et intestinal, Kälin et collaborateurs ne montrent aucune différence d'expression entre le CFTR-wt et le CFTR-F508del, en termes d'intensité de signal et de localisation. Suite à des observations différentes faites dans l'épithélium des glandes sudoripares, un défaut d'expression tissu spécifique de la protéine mutée chez les patients homozygotes F508del a été proposé. Des éléments, autres qu'une localisation défectueuse du canal CFTR, joueraient un rôle dans le développement de la maladie pulmonaire et intestinale chez les patients (Kälin *et al.*, 1999). Ces observations sont en accord avec les études de Penque *et al.*, et Carvalho-Oliveira *et al.*, qui rapportent la présence de CFTR dans la région apicale de cellules épithéliales colonnaires nasales (cellules TCE, *tall columnar epithelial cells*) issues de patients homozygotes F508del (Penque *et al.*, 2000, Carvalho-Oliveira *et al.*, 2004). Néanmoins, le pourcentage de cellules arborant une expression apicale du canal est significativement plus faible que chez les personnes hétérozygotes F508del. En moyenne, près de 22 % des cellules TCE provenant de patients homozygotes présentent une localisation apicale de la protéine CFTR, contre 42 % et 56 % respectivement chez les patients hétérozygotes et les sujets sains (Penque *et al.*, 2000). Des études fonctionnelles viennent appuyer ces observations. Une sécrétion Cl⁻ résiduelle, dépendante du CFTR, a été enregistrée lors d'expérimentations conduites sur des épithélia intestinaux (rectum) et respiratoires (voies hautes) provenant de sujets homozygotes pour la mutation F508del (Bronsveld *et al.*, 2000, Bronsveld *et al.*, 2001).

Pour expliquer ces divergences, il a été suggéré que l'expression et la localisation du CFTR pourraient être influencées par son micro-environnement. Ce dernier pourrait se révéler différent selon que l'on soit en présence de voies aériennes saines ou présentant un phénotype CF (Borthwick *et al.*, 2011). Une comparaison de l'expression du CFTR entre des cellules situées au-dessus (CF) et en-dessous (non-CF) d'une anastomose bronchique et prélevées simultanément sur le même individu a été entreprise. Aucune différence significative dans le pourcentage de cellules TCE présentant une expression apicale du CFTR n'a été observée. Cependant, l'intensité du marquage apical (moyenne et totale) était significativement diminuée dans les cellules CF par rapport aux cellules non-CF. Ainsi, lorsque les cellules TCE (CF et non-CF) sont isolées à partir de voies respiratoires présentant un micro-environnement identique, seule la quantité de CFTR localisée dans la membrane plasmique diffère. Dans ces cellules, la mutation F508del n'entraîne pas un défaut de transport intracellulaire en soi mais réduit nettement la quantité de protéine localisée à la membrane apicale, en y altérant sa stabilité (Borthwick *et al.*, 2011).

Enfin, plus récemment, une corrélation entre l'expression apicale du CFTR dans l'épithélium nasal et le degré de sévérité de la maladie pulmonaire chez les sujets homozygotes pour la mutation F508del a été mise en évidence. Le groupe de J.M. Beekman a en effet observé une variabilité

A.



B.

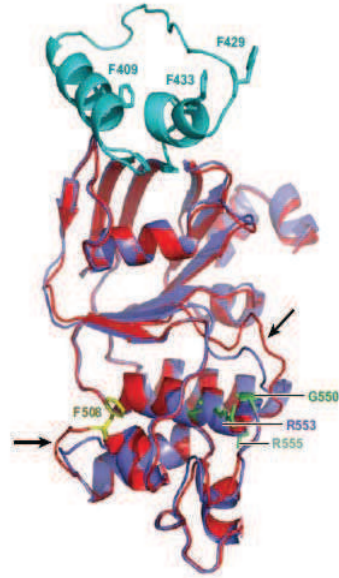


Figure 30 (A-B) : Comparaison de la structure du NBD1 sauvage et F508del

A. Comparaison localisée, entre les résidus 502 et 524, des structures des NBD1 sauvage (bleu) et F508del (gris). Leur superposition montre que la structure cristalline du NBD1 n'est que très peu affectée par la perte du résidu F508del. **B.** Sont représentées les structures entières des NBD1 sauvage (rouge) et F508del (violet). Les différentes majeures sont indiquées par des flèches noires. L'insertion régulatrice (résidu 404 à 436) (cyan), le résidu F508 (jaune) et quelques acides aminés ciblés lors des mutations « révertantes » (G550, G553, G555) et « solubilisantes » (F409, F429, F433) sont mentionnés.

NBD1 : domaine de liaison à l'ATP (*nucleotide binding domain*)

A. d'après Deber et al., 2008, B. d'après la revue de Riordan, 2008

inter-individus CF dans la proportion de cellules possédant une expression apicale du CFTR-F508del, laquelle est positivement corrélée à la mesure du VEMS (van Meegen *et al.*, 2013).

6.2. Défauts intradomaines (NBD1) et intramoléculaires (CFTR) conférés par la perte du résidu F508

De nombreuses études biophysiques et biochimiques sont conduites dans le but de comprendre comment la mutation F508del perturbe le repliement du NBD1, et donc le processus d'assemblage de la protéine CFTR.

En 2005, Lewis et collaborateurs rapportent que la mutation F508del n'impacte que très peu la structure cristalline du NBD1 (**Figure 30**). Néanmoins, ces études cristallographiques ont permis d'observer des changements de la topographie de surface au niveau du site de mutation. Ce site étant localisé dans une région du NBD1 proposée pour interagir avec TMD1, les auteurs avaient suggéré que la mutation F508del perturbait principalement des interactions interdomaines plutôt que le repliement du NBD1 lui-même (Lewis *et al.*, 2005). Des travaux conduits plus récemment sur le domaine isolé révèlent toutefois que l'absence du résidu F508 altère significativement la stabilité cinétique et thermodynamique du NBD1. La perte de cet acide aminé diminue fortement l'efficacité de repliement de ce domaine, le rendant susceptible au dépliement, à la dénaturation et à l'agrégation à 37°C (Protasevich *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010a, Lewis *et al.*, 2010).

Par ailleurs, en plus de déstabiliser directement NBD1, il est maintenant bien établi que la mutation F508del interfère également avec le repliement des TMDs (TMD1, TMD2) et du NBD2. Ces anomalies conformationnelles compromettent les interactions interdomaines (NBD1/NBD2 et TMD1/TMD2) requises pour un assemblage post-traductionnel correct de la protéine (Du *et al.*, 2005, Cui *et al.*, 2007, Du et Lukacs, 2009, He *et al.*, 2010, Thibodeau *et al.*, 2010, pour revue : Kim et Skach, 2012) (**Figure 31**). De plus, la mutation F508del élimine un contact hydrophobe entre NBD1 et TMD2, essentiel pour un bon assemblage et une ouverture efficace du canal [Thibodeau *et al.*, 2005, Serohijos *et al.*, 2008, voir § 3.2.3 (**Figure 13**)].

Les conséquences de la perturbation de l'interface NBD1/NBD2 ne sont pas encore totalement élucidées. Il semblerait que l'altération de cette interface n'ait pas d'effet significatif sur l'assemblage global de la protéine CFTR (Thibodeau *et al.*, 2010). Bien que nécessaire pour l'activation du canal CFTR à la membrane, NBD2 ne serait pas primordial pour la biosynthèse de la protéine et sa sortie du RE. En accord avec cette conclusion, l'introduction de la mutation F508del dans des constructions de CFTR-wt déficientes pour NBD2 empêche l'adressage de la protéine à la membrane plasmique. Cette observation supporte l'idée selon laquelle la délétion F508 impacte des aspects de l'assemblage du CFTR autre que l'interaction NBD1/NBD2 (Cui *et al.*, 2007).

Plus récemment, les groupes de G.L. Lukacs et de P.J. Thomas observent que l'introduction de mutations de second site (*second-site mutation*), dites « révertantes », (G550E, R553M, R555K ou I539T) au niveau du NBD1-F508del n'est pas suffisante pour restaurer un assemblage correct de la protéine mutée entière. Bien que ces mutations corrigent entièrement les défauts de stabilité cinétique

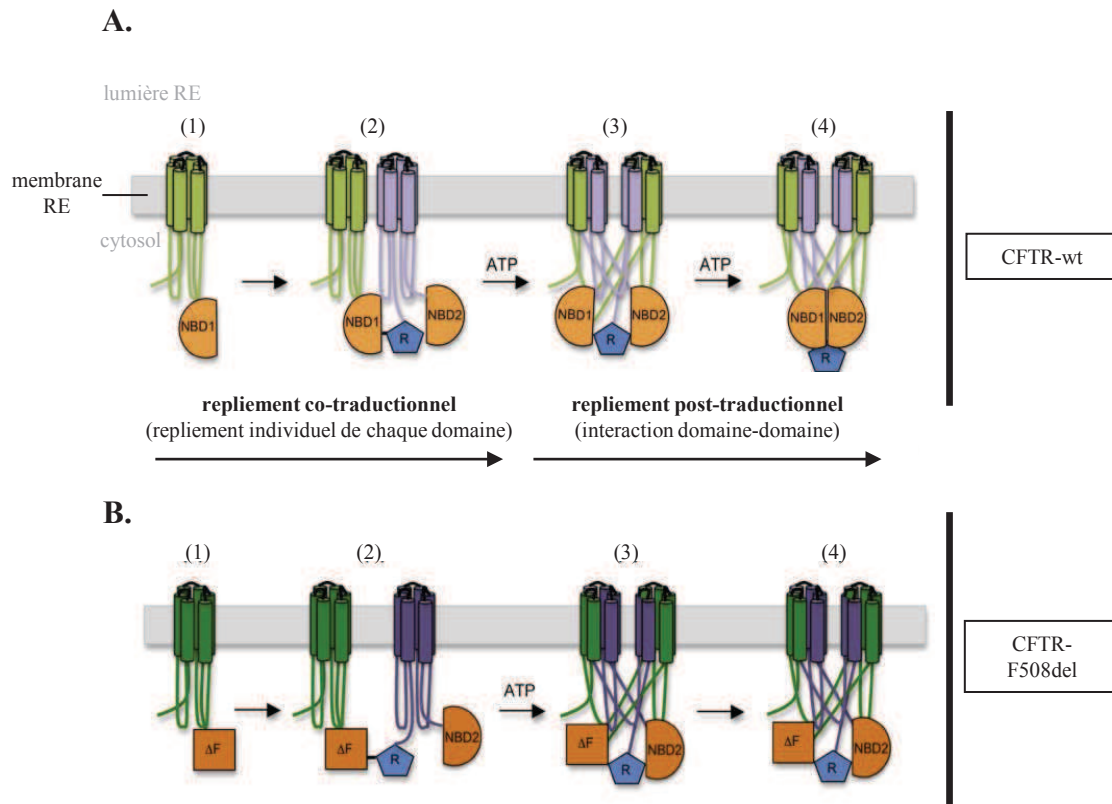


Figure 31 (A-B) : Altération du processus d'assemblage de la protéine CFTR-F508del

A. Le repliement de la protéine CFTR commence de manière co-traductionnelle (1→2) et se poursuit par la formation post-traductionnelle des contacts inter-domaines (3→4). **B.** La délétion du résidu F508del va compromettre l'assemblage coopératif des domaines. En plus de déstabiliser NBD1 et de perturber le contact NBD1/ICL4, il a été montré que la mutation F508del interférerait avec le repliement du TMD1, TMD2 et NBD2. Ceci impacte la création des interfaces TMD1/TMD2 et NBD1/NBD2 et donc l'assemblage global de la protéine.

ATP : adénosine triphosphate, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, ICL4 : boucle intracytoplasmique n°4 (*intra-cellular loop*), NBD1 et NBD2 : domaines de liaison à l'ATP (NBDs, *nucleotide binding domain*), N-ter : extrémité N-terminale, TMD1 et TMD2 : domaines transmembranaires (TMDs, *transmembrane domains*), R : domaine régulateur, RE : réticulum endoplasmique, wt : sauvage (*wild-type*)

A. & B. adaptée de la revue de Kim et Skach, 2012

et thermique du NBD1-F508del isolé, elles ne restaurent que partiellement l'assemblage de la protéine mutée entière, à hauteur de 15 % du CFTR-wt (Rabeh *et al.*, 2012, Mendoza *et al.*, 2012). Cependant, lorsque ces mutations sont introduites en combinaison avec des mutations reconstituant une interface NBD1/ICL4 similaire à celle observée pour le CFTR-wt, alors la correction des mutants stabilisés s'avère totale. Par ailleurs, des mutations faux-sens localisées au niveau de l'hélice de couplage de l'ICL4 (L1065P, R1066C et G1069R) sont décrites pour induire une rétention de la protéine mutée dans le RE. Cela renforce le rôle joué par cette région dans la médiation d'importantes interactions lors du repliement post-traductionnel de la molécule CFTR (Mendoza *et al.*, 2012).

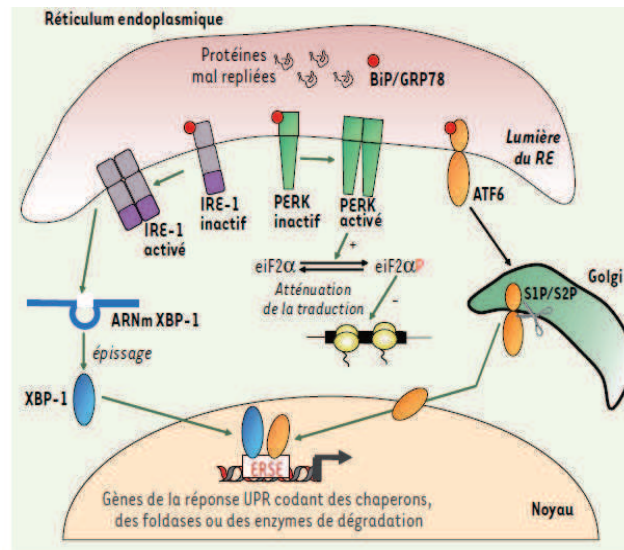
La stabilité thermodynamique du NBD1, de même que l'interface NBD1/TMD2, se doivent donc d'être corrigées afin de retrouver pour la protéine CFTR-F508del une efficacité de biosynthèse et une stabilité post-traductionnelle proches de celles observées pour la protéine sauvage (Mendoza *et al.*, 2012, Rabeh *et al.*, 2012). Le développement de petites molécules correctrices qui agissent au niveau de ces deux étapes du repliement de la protéine CFTR (co- et post-traductionnelle) est primordial pour espérer améliorer efficacement la sécrétion d'ions Cl^- (et HCO_3^-) chez les patients.

6.3. La protéine CFTR-F508del et les chaperons moléculaires

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer la rétention de la protéine CFTR-F508del dans le RE et sa progression limitée vers l'appareil de Golgi. Selon certains auteurs, la reconnaissance du signal d'adressage di-acidique par la machinerie du complexe COPII est perturbée par la perte du résidu F508 (Chang *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2004). Pour d'autres, la rétention de la protéine mutée dans le RE repose sur des modifications d'interaction avec les chaperons moléculaires (Pind *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 2006). C'est cette deuxième hypothèse qui prédomine dans la communauté scientifique.

Le chaperon Hsc70 présente une interaction plus robuste avec le polypeptide CFTR-F508del naissant qu'avec le CFTR-wt (Meacham *et al.*, 1999, Rubenstein et Zeitlin, 2000). Cette association prolongée préviendrait l'interaction entre NBD1 et le domaine R. Des sites nécessaires à cette interaction interdomaines pourraient être masqués par la non dissociation du couple Hdj-2/Hsc70 (Meacham *et al.*, 1999). En cohérence avec ces observations, Scott-Ward et Amaral ont rapporté, suite à l'utilisation de la technique de résonance plasmonique de surface (SPR, *surface plasmon resonance*), une interaction plus forte entre le NBD1-F508del et Hsc70 comparativement au NBD1-wt [constante de dissociation (K_D) de 2.6 nanomolaire (nM) et 13.9 nM respectivement] (Scott-Ward et Amaral, 2009). Cette association prolongée avec Hsc70 laisse présager une plus forte probabilité du déclenchement de la voie de l'ERAD. En effet, certains chaperons facilitant l'assemblage de la protéine CFTR peuvent également être impliqués dans sa dégradation. C'est notamment le cas de Hsc70. Il semble que le complexe Hsc70/CHIP joue un rôle majeur dans la reconnaissance des perturbations structurales cytosoliques engendrées par la mutation F508del (Meacham *et al.*, 2001, Younger *et al.*, 2004, pour revue : Kim et Skach, 2012). Les molécules CFTR-F508del ainsi identifiées (ubiquitinées) sont alors rapidement dégradées par les composants du protéasome 26S.

A.



B.

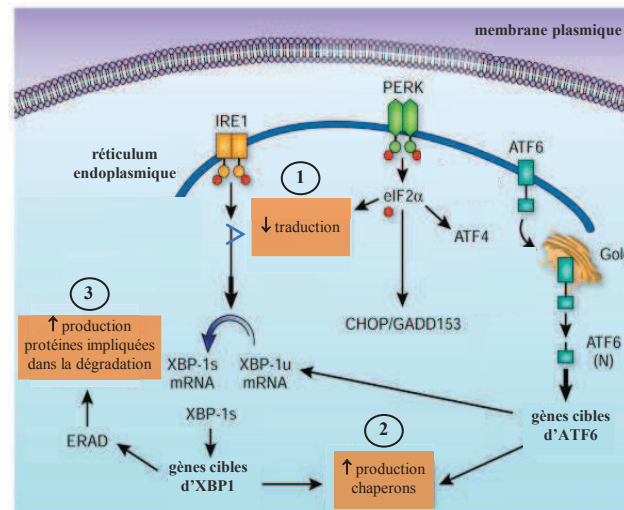


Figure 32 (A-B) : Représentation des différentes voies de signalisation activées au cours de l'UPR

A. En absence de stress du RE, la protéine BiP/GRP78, schématisée par des sphères rouges, maintient les différents senseurs de l'UPR, à savoir IRE1, PERK et ATF6, dans un état inactif. L'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE entraîne une dissociation du chaperon GRP78, laquelle va permettre l'activation des différentes voies de signalisation associées aux effecteurs. **B.** Deux voies caractérisent la réponse UPR : une voie traductionnelle et une voie transcriptionnelle. Dans le but de rétablir l'homéostasie du RE, l'activation de PERK va conduire à une répression de la synthèse protéique (1) et celle des senseurs IRE1 et ATF6 va favoriser la production des chaperons du RE et des protéines du système ERAD (2, 3). Enfin, si la cellule n'arrive pas à faire à cette situation de stress, l'apoptose peut être déclenchée.

ARNm : acide ribonucléique messager, ATF4, ATF6 : activating transcription factor 4 & 6, Bip (GRP78) : 78 kDa glucose-regulated protein, CHOP : C/EBP-homologous protein, ER : endoplasmic reticulum, ERAD : ER-associated degradation, ERSE : ER stress response element, GADD : growth arrest- and DNA damage-inducible gene, IRE1 : inositol requiring 1, kDa : kilodalton, mRNA : messenger ribonucleic acid, PERK : PKR like endoplasmic reticulum kinase, RE : réticulum endoplasmique, S1P, S2P : site 1 & 2 protease, UPR : unfolded protein response, XBP1 : X-box binding protein 1

A. d'après la revue de Fufelle et Ferré, 2007, B. adaptée de Hotamisligil, 2010

Le co-chaperon Aha1 jouerait un rôle important dans la stabilisation du CFTR promue par Hsp90 (Sun *et al.*, 2008). Néanmoins, de façon similaire à Hsc70, il semble que l'interaction Hsp90/CFTR soit en fait plus complexe que ce qu'il ne paraissait au départ (Wang *et al.*, 2006, Koulov *et al.*, 2010). Comme Hsc70, Aha1, montre une plus grande affinité pour le CFTR-F508del (Wang *et al.*, 2006, Sun *et al.*, 2008). Par ailleurs, la surexpression de Aha1 diminue la stabilité du CFTR-F508del et conduit à sa dégradation, alors que son inhibition améliore le processus de biosynthèse du CFTR muté (stabilisation, export à partir du RE et adressage à la membrane plasmique) (Wang *et al.*, 2006). Ainsi, la liaison initiale entre Hsp90 et le CFTR semble essentielle à l'obtention d'une biosynthèse fructueuse. Cependant, si cette interaction se prolonge, le CFTR sera dirigé vers la voie de dégradation ubiquitine-dépendante (pour revue : Chanoux et Rubenstein, 2012).

Le rôle de la CNX dans la régulation de la biogenèse du CFTR n'est pas encore totalement clarifié. Des données initiales rapportent que, comparativement au CFTR-wt, l'interaction du CFTR-F508del avec la lectine est prolongée, suggérant un rôle de la CNX dans la rétention de la protéine mal conformée dans le RE (Pind *et al.*, 1994, Okiyonedo *et al.*, 2004a). Cependant, plusieurs études ont depuis dressé un tableau plus complexe de cette régulation. Ni le transport intracellulaire du CFTR-F508del, ni la sécrétion Cl⁻ ne sont impactés par la déplétion totale de la CNX. Ce chaperon seul n'est donc pas suffisant pour expliquer la rétention et la dégradation du CFTR-F508del (Farinha et Amaral, 2005, Okiyonedo *et al.*, 2008). Corroborant ces observations, l'équipe de M. Gentzsch a montré que la protéine CFTR-F508del non glycosylée n'échappe pas au contrôle de qualité mis en place dans les étapes précoces de la voie de sécrétion et reste associée au RE (Chang *et al.*, 2008). Contrairement au CFTR-wt immature mal conformé, un autre point de contrôle, en amont et indépendant de la CNX, serait capable de prendre en charge le CFTR-F508del et de le diriger vers la dégradation. Ceci serait probablement assuré par la machinerie Hsp/c70 (Farinha et Amaral, 2005). Toutefois, il est à noter que cette conclusion n'est pas en adéquation avec certains travaux démontrant une interaction directe entre la CNX et le CFTR-F508del (Pind *et al.*, 1994, Egan *et al.*, 2002, Norez *et al.*, 2006b, Norez *et al.*, 2009).

Enfin, il a été montré que l'accumulation de CFTR-F508del anormalement repliés dans le RE pouvait conduire à l'activation de l'UPR (Kerbiriou *et al.*, 2007, Bartoszewski *et al.*, 2008, Gomes-Alves *et al.*, 2010). Cette réponse, mise en place lors d'un stress du RE, vise à y rétablir l'homéostasie en y augmentant d'une part, la capacité de repliement des polypeptides naissants (via la synthèse de protéines chaperons) et d'autre part, l'élimination des protéines présentant une conformation aberrante (via la synthèse de protéines impliquées dans le système ERAD). L'activation de l'UPR peut également être à l'origine d'une répression transitoire de la traduction, ceci afin de limiter l'afflux de protéines dans le RE déjà saturé (pour revues : Schroder et Kaufman, 2005a,b) (**Figure 32**). Une hausse de l'expression du chaperon BiP/GRP78 ainsi que l'activation d'une des branches de la réponse UPR (associée au transducteur ATF6) ont été observées dans des cellules exprimant le mutant CFTR-F508del (Kerbiriou *et al.*, 2007). Au cours de ces travaux, Kerbiriou et collaborateurs rapportent également que l'inhibition de l'expression d'ATF6 corrige le défaut de transport de la protéine mutée, comme en témoigne une amélioration des transports ioniques dépendants du

CFTR-F508del (Kerbiriou *et al.*, 2007). Plus récemment, des travaux ont confirmé l'augmentation de l'expression de la protéine chaperon GRP78 dans des cellules exprimant le CFTR-F508del et révélé celle d'autres marqueurs, comme la GRP94 et la protéine disulfure isomérase (PDI, *protein disulfide isomerase*) (Gomes-Alves *et al.*, 2010).

6.4. Comportement du canal CFTR-F508del à la membrane plasmique

6.4.1. Défaut fonctionnel

Une fois insérée dans la membrane plasmique, la protéine mutée conserve la capacité à transporter des ions Cl⁻ de manière AMPc-dépendante. Toutefois, d'importantes différences avec la protéine sauvage sont observées.

Le canal CFTR-F508del possède une séquence de perméabilité anionique comparable à celle de la protéine CFTR-wt. Cependant des analyses électrophysiologiques (patch-clamp) rapportent une forte réduction de la Po et une augmentation du temps de fermeture du canal (Dalemans *et al.*, 1991, Haws *et al.*, 1996). De plus, la mutation F508del atténue considérablement l'activation dépendante de la phosphorylation par la PKA du canal CFTR (Hwang *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2000a). Le taux d'activation du CFTR-F508del est sept fois plus faible que celui observé pour le CFTR-wt (Wang *et al.*, 2000a). Enfin, il a également été observé que l'activité canal du CFTR-F508del était davantage thermolabile que celle du canal sauvage, cette dernière déclinant rapidement à 37°C (Hegedus *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2012).

Les mécanismes qui sous-tendent le défaut d'ouverture/fermeture du canal muté sont encore mal compris. Une des pistes avancées est l'altération de la liaison entre l'hélice de couplage de l'ICL4 et la surface du NBD1. En perturbant fortement la création de l'interface NBD1/ICL4, l'absence du résidu F508 pourrait compromettre le processus d'ouverture du canal (pour revues : Hwang et Sheppard, 2009, Lukacs et Verkman, 2012). Plus récemment, Jih et collaborateurs ont observé que l'utilisation d'un analogue de l'ATP, le P-dATP [N6-(2-phenylethyl)-2'-deoxy-ATP], augmentait la Po du canal, suggérant que le défaut d'ouverture du canal muté puisse engager les NBDs. La mutation F508del déstabiliserait les états dimériques total et partiel (NBD1 et NBD2 associés via le site composite I) des NBDs (Jih *et al.*, 2011).

6.4.2. Instabilité à la surface cellulaire

Le canal CFTR-F508del restauré à la membrane apicale (rCFTR-F508del, *rescued CFTR-F508del*) présente une très grande instabilité métabolique et fonctionnelle. Ceci constitue une limitation à l'utilisation seule des molécules correctrices comme approche thérapeutique pour la mucoviscidose.

L'accumulation de protéines aberrantes à la surface cellulaire est limitée par leur prise en charge rapide par le système de contrôle de qualité des protéines mis en place au niveau périphérique (PPQC, *peripheral protein quality control*) (Okiyoneda *et al.*, 2010). L'action de chaperons tels que Hsc70 et Hsp90, agissant de concert avec leurs co-chaperons Hdj-2, Hop (*Hsc70/Hsp90-organizing*

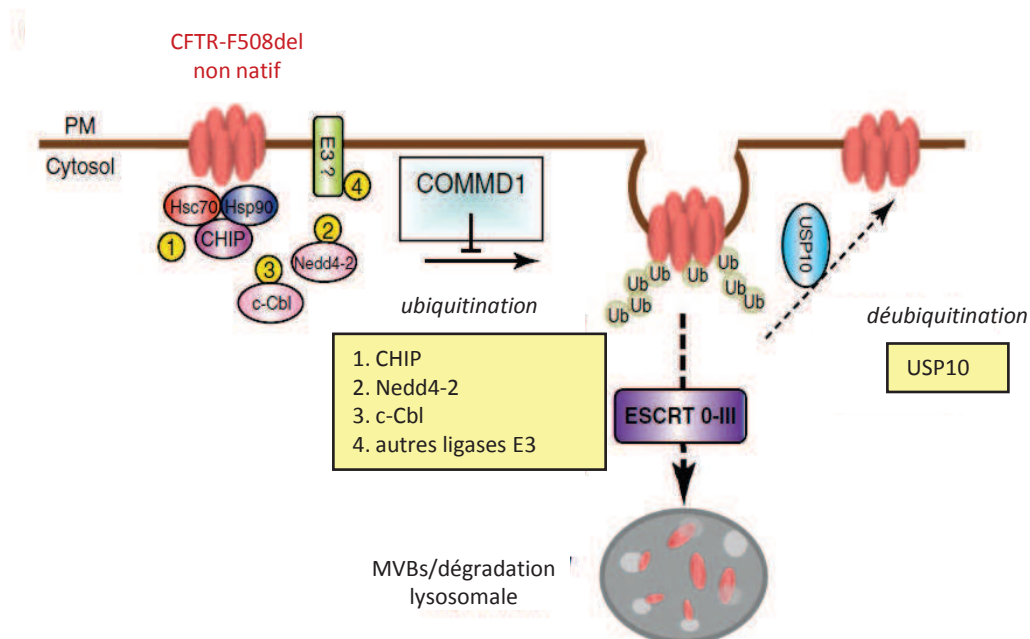


Figure 33 : Le CFTR-F508del et le contrôle de qualité périphérique des protéines

L'accumulation, à la surface cellulaire, de protéines présentant une mauvaise conformation est limitée par la mise en place du système de contrôle de qualité périphérique des protéines (PPQC). C'est notamment le cas du CFTR-F508del restauré à la surface apicale suite à une incubation à basse température (27°C) ou à un traitement avec un correcteur. Son ubiquitination, dépendante (CHIP) ou indépendante (Nedd4-2) des protéines chaperons (Hsc70, Hsp90), contribue à son internalisation rapide. Les canaux ainsi ubiquitinés sont reconnus par la machinerie ESCRT 0-III, laquelle les redirige de la voie de recyclage vers la dégradation lysosomale.

Une interaction entre le CFTR et la protéine COMMD1 (*copper metabolism (Murr1) domain containing 1*) a été rapportée. Par un mécanisme encore inconnu, cette liaison protégerait le CFTR de l'ubiquitination, favorisant ainsi son expression à la membrane plasmique (Drévilion *et al.*, 2011)

CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CHIP : *C-terminus of Hsc70-interacting protein*, COMMD1 : *copper metabolism (Murr1) domain containing 1*, ESCRT 0-III : *endosomal sorting complexes required for transport*, Hsc70 : *heat shock cognate protein 70*, Hsp90 : *heat shock protein 90*, MVBs : *corps multi-vésiculaires (multivesicular bodies)*, PPQC : *peripheral protein quality control*, USP10 : *ubiquitin specific peptidase*

adaptée de la revue de Lukcas et Verkman, 2012

protein), Aha-1 et l'ubiquitine-ligase CHIP, est requise pour la reconnaissance, l'ubiquitination, l'endocytose et la dégradation lysosomale des molécules CFTR mutées non natives ayant atteint la surface apicale (Okuyoneda *et al.*, 2010, pour revue : Okuyoneda *et al.*, 2011) (**Figure 33**). Suite à leur endocytose, les canaux CFTR ubiquitinés sont reconnus par les composants de la machinerie ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*), qui les redirigent des endosomes de recyclage vers la dégradation lysosomale (ELAD, *endolysosomal-associated degradation*) (Okuyoneda *et al.*, 2010, pour revue : Lukacs et Verkman, 2012). Pour contrecarrer ce processus, la surexpression de la protéine USP10 (*ubiquitin specific peptidase*) apparaît être une piste intéressante. Cette enzyme de débubiquitination stabilise métaboliquement le CFTR-wt à la membrane, en facilitant son recyclage post-endocytique et en retardant son ciblage vers les lysosomes (Bomberger *et al.*, 2010).

Dès 1993, le groupe de S. Grinstein rapporte que la stabilité fonctionnelle des protéines mutées ayant atteint la surface cellulaire est largement compromise (Lukacs *et al.*, 1993). Alors que le CFTR-wt présente une demi-vie excédant les 48 heures à la membrane plasmique, celle du rCFTR-F508del ne dépasse pas les 4 heures. Cette instabilité biochimique corrèle avec les changements observés dans le transport ionique médié par le rCFTR-F508del (Lukacs *et al.*, 1993, Heda *et al.*, 2001). Plusieurs propositions avaient alors été faites pour expliquer la réduction de la demi-vie du rCFTR-F508del à la surface cellulaire : internalisation plus rapide (Heda *et al.*, 2001) et diminution de l'efficacité du recyclage (Sharma *et al.*, 2004).

La majorité des travaux conduits initialement utilisait des systèmes d'expression hétérologues non polarisés et/ou d'origine non humaine : cellules épithéliales murines C127 non polarisées (Lukacs *et al.*, 1993), cellules épithéliales rénales de porc LLC-PK1 polarisées (Heda *et al.*, 2001) et fibroblastes rénaux de hamsters (BHK-21) non polarisés (Sharma *et al.*, 2004). Le groupe de B.A. Stanton a, quant à lui, décidé d'étudier les différents aspects de l'endocytose du CFTR dans les lignées CFBE41o-wt et CFBE41o-F508del polarisées, dérivant de la lignée parentale CFBE41o- (Swiatecka-Urban *et al.*, 2005). Les mêmes modèles (non polarisés) ont été utilisés lors de mon travail de thèse, il apparaît donc important d'énoncer les principales observations faites au cours de leur étude : i) le rCFTR-F508del présente une demi-vie d'une heure à la membrane apicale contre 3 heures pour le CFTR-wt, ii) l'endocytose du rCFTR-F508del est augmentée comparativement à celle du CFTR-wt (près de 10 % de rCFTR-F508del endocytosé en 5 minutes contre moins de 4 % pour le CFTR-wt), iii) les CFTR-wt et rCFTR-F508del sont recyclés à la surface cellulaire de manière équivalente, leur recyclage étant facilité par la protéine Rab11a (CFTR-wt et -F508del co-immunoprécipités avec Rab11a), et enfin iv) l'endocytose accélérée et la diminution de la demi-vie apicale du rCFTR-F508del ne sont pas le fruit d'un défaut général du processus endocytique [la demi-vie du transporteur BCRP (*breast cancer resistance protein*), de même que l'expression de la protéine Rab5a, sont identiques entre les deux lignées cellulaires]. Ainsi, la mutation F508del écourte la demi-vie à la membrane apicale du rCFTR-F508del en y accélérant spécifiquement son endocytose mais sans affecter son processus de recyclage (Swiatecka-Urban *et al.*, 2005).

Ces observations ont été, en partie, confirmées par Varga et collaborateurs (Varga *et al.*, 2008). Par ailleurs, cette étude rapporte que le rCFTR-F508del présente à 27°C une internalisation plus lente

ainsi qu'une demi-vie plus importante qu'à 37°C. De telles observations sous-entendent que le défaut du processus endocytaire du rCFTR-F508del serait thermosensible (Varga *et al.*, 2008).

Toujours dans le but de caractériser la stabilité apicale, l'internalisation et le recyclage du CFTR, le groupe de M. Gentsch s'est tourné vers l'utilisation d'un modèle plus pertinent d'un point de vue physiologique : des cultures primaires de cellules épithéliales des voies aériennes humaines (HAE, *human airway epithelial*) hautement différenciées. Dans ce modèle, le rCFTR-F508del transite de la membrane apicale vers les compartiments endosomaux plus rapidement que le CFTR-wt et présente un recyclage beaucoup moins efficace (Cholon *et al.*, 2009). En cohérence avec des travaux développés dans le paragraphe 5.1.1, les auteurs suggèrent que des propriétés intrinsèques du CFTR, et notamment sa N-glycosylation, peuvent affecter sa stabilité à la surface cellulaire. Les deux chaînes oligosaccharidiques localisées sur l'ECL4, non primordiales pour l'adressage apical du canal, seraient par contre requises pour un recyclage efficace du CFTR. Elles présenteraient une information essentielle pour le ciblage apical des protéines CFTR contenues dans les compartiments endosomaux (Chang *et al.*, 2008, Cholon *et al.*, 2009).

Plus récemment, afin d'expliquer la plus grande mobilité du rCFTR-F508del à la surface cellulaire, Valentine et collaborateurs ont testé l'hypothèse d'interactions réduites avec les protéines PDZ. De façon originale, l'utilisation de la technique du « *single particle tracking* » a permis de mesurer la mobilité apicale du CFTR dans des cellules vivantes. Une corrélation entre une internalisation accélérée du rCFTR-F508del et une réduction des interactions avec les protéines PDZ a été établie (Valentine *et al.*, 2012). Les acteurs du PPQC ont alors été mis en cause pour expliquer cette diminution. En effet, les interactions avec les protéines PDZ pourraient être gênées par l'ubiquitination du rF508del-CFTR, de même que stériquement entravées par le complexe formé entre le rCFTR-F508del et différents protagonistes du PPQC (Hsc70, Hsp90 et CHIP) (Valentine *et al.*, 2012).

Dans le but d'améliorer efficacement le phénotype engendré par la perte du résidu F508, le développement d'un composé capable d'intervenir au niveau des trois anomalies majeures énoncées ci-dessus se révèle nécessaire. Cette « molécule idéale » devra donc être capable : i) de restaurer efficacement le transport du CFTR-F508del à la membrane apicale, en améliorant les processus de repliement intradomains et d'assemblage de la protéine mutée et/ou en l'aidant à échapper à l'ERQC (= action correctrice), ii) d'augmenter l'activité AMPc-dépendante compromise du canal CFTR-F508del à la membrane, afin d'atteindre des niveaux similaires à ceux du canal CFTR-wt (= action potentiatrice), et enfin iii) d'élever la stabilité des canaux mutés à la surface cellulaire (= action stabilisatrice) (Jurkuvenaite *et al.*, 2010, pour revue : Molinski *et al.*, 2012).

7. La recherche et le développement de stratégies thérapeutiques

Actuellement, la grande majorité des traitements proposés aux patients vise à soulager les différentes manifestations de la maladie. Cela inclut des antibiotiques, des agents anti-inflammatoires,

des mucolytiques, l'inhalation de solutions salines hypertoniques, le remplacement des enzymes pancréatiques et, en ultime recours, la transplantation pulmonaire lors d'insuffisance respiratoire installée. Bien que ces stratégies permettent d'améliorer significativement l'espérance de vie et la qualité de vie des malades, le développement de thérapies s'attaquant aux causes et non pas aux conséquences de la maladie suscite bien évidemment un très grand intérêt parmi les différents groupes de recherche.

Encore incomplètes, les nombreuses connaissances acquises depuis plus de 20 ans sur le gène et la protéine CFTR ont considérablement amélioré la compréhension de la physiopathologie de la maladie. Ces progrès réalisés permettent l'exploration de différentes approches thérapeutiques à visée plus curative, comme le remplacement du gène anormal par la thérapie génique, la reconstitution d'un épithélium respiratoire fonctionnel grâce à la thérapie cellulaire ou encore l'identification de petites molécules spécifiques à chaque classe de mutations, englobée sous le terme de *thérapie de la protéine*.

7.1. Des stratégies adaptées à chaque classe de mutations

La discussion se focalisera davantage sur les différents composés identifiés pour corriger les défauts conférés par les mutations de **classe I, II et III**.

7.1.1. Translecture de codons stop prématurés : mutations de **classe I**

Les patients porteurs de mutations entraînant l'apparition d'un codon de terminaison prématuré présentent des phénotypes très sévères de la maladie. En effet, la dégradation rapide des transcrits *CFTR* arborant cette anomalie conduit, *in fine*, à l'absence de protéine CFTR à la membrane plasmique des cellules épithéliales.

La recherche de molécules permettant aux ribosomes de franchir le codon stop prématuré a été initiée avec la gentamicine, un antibiotique de la famille des aminoglycosides. Bien qu'elle permette de restaurer une présence apicale de protéines CFTR entières (Wilschanski *et al.*, 2003), la toxicité de ce composé limite grandement son utilisation chez les malades. La molécule PCT124™ (ou Ataluren), dont l'essai clinique international de phase III s'est achevé l'année dernière, représente une piste très sérieuse. Les patients montrent une amélioration progressive de leur fonction pulmonaire et une bonne tolérance envers la molécule (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010a , Wilschanski *et al.*, 2011).

7.1.2. Identification de correcteurs promouvant l'adressage à la membrane de protéines mutées présentant un défaut de maturation conformationnelle : mutations de **classe II**

Conservant une certaine fonctionnalité, de nombreux efforts ont été entrepris dans la recherche de composés permettant à la protéine CFTR-F508del d'échapper au système ERAD. Bien que l'identification de correcteurs spécifiques s'avère essentielle, on sait aujourd'hui que cette seule approche n'est pas suffisante pour espérer améliorer efficacement le phénotype des patients homozygotes pour la mutation F508del.

a. Avant-propos : différentes pistes pour restaurer le CFTR-F508del à la surface cellulaire

Une caractéristique majeure du mutant CFTR-F508del est sa thermosensibilité. Alors qu'à 37°C une grande majorité des protéines CFTR-F508del mal conformées sont rapidement dégradées par le système ERAD, les mutants parviennent à échapper à l'ERQC et sont adressés à la membrane apicale pour des températures comprises entre 25 et 29°C (température permissive) (Denning *et al.*, 1992). Mis en évidence il y a une vingtaine d'années, la compréhension de ce processus est encore loin d'être complète. Selon une étude récente, une température réduite altérerait la fonction du protéasome (Jurkuvenaite *et al.*, 2010).

Des molécules chimiques, comme le glycérol (Sato *et al.*, 1996) et le DMSO (diméthylsulfoxyde) (Bebok *et al.*, 1998), permettent également de restaurer une présence apicale du CFTR-F508del. Le glycérol, connu pour stabiliser la structure des protéines, améliorerait l'efficacité du processus de repliement des protéines mutées. Cela conduit à l'enregistrement d'une conductance Cl⁻ dépendante de l'AMPc dans des cultures de cellules traitées (Sato *et al.*, 1996). Néanmoins, le manque de spécificité et la toxicité de ces *chaperons chimiques* limitent grandement leur utilisation thérapeutique.

Des approches comme le criblage à haut débit (HTS, *high-throughput screening*) se sont révélées très fructueuses et ont permis l'identification de centaines de correcteurs. Malheureusement, la plupart des molécules identifiées présentent une efficacité correctrice limitée et une certaine toxicité. De plus, à la différence des potentiateurs, l'effet des correcteurs est fortement influencé par le contexte cellulaire, avec des cas extrêmes où l'efficacité d'une molécule n'est rapportée que dans un seul type cellulaire (Pedemonte *et al.*, 2010).

Le mécanisme d'action des correcteurs identifiés reste en grande partie inexpliqué. Il serait en fait plus juste de parler de multiples mécanismes d'action. En effet, certains composés sont capables d'exercer leurs effets, de façon spécifique, via une interaction directe avec le CFTR muté. Ils sont qualifiés de *chaperons pharmacologiques*. D'autres se révèlent beaucoup moins spécifiques car ils impactent l'expression et l'activité de la machinerie du contrôle de qualité des protéines (RE et membrane apicale). Ils sont qualifiés de *régulateurs de la protéostasie* (pour revues : Lukacs et Verkman, 2012, Molinski *et al.*, 2012).

b. Modulation de l'expression et de l'activité des chaperons moléculaires

Les protéines chaperons apparaissent comme des cibles thérapeutiques potentielles. Leur manipulation pourrait permettre de limiter la dégradation de la protéine CFTR-F508del, d'augmenter son export à partir du RE, et donc sa présence à la membrane apicale.

De nombreux composés chimiques perturbant l'activité de Hsc70 ont été développés. Un des plus connus, le 4-phénylbutyrate de sodium (4-PBA, ou Buphenyl), améliore le transport intracellulaire du CFTR-F508del, restaurant une sécrétion Cl⁻ dépendante du CFTR dans des cellules épithéliales CF (Rubenstein *et al.*, 1997). Parallèlement à la diminution de l'expression protéique de Hsc70, le composé 4-PBA augmente l'expression de Hsp70, perturbant les interactions de ces deux chaperons avec la protéine CFTR-F508del (Rubenstein et Zeitlin, 2000, Rubenstein et Lyons, 2001, Choo-Kang et Zeitlin, 2001, Suaud *et al.*, 2011). Toutefois, lors d'essais cliniques conduits sur des sujets

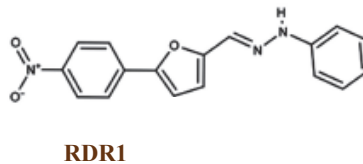
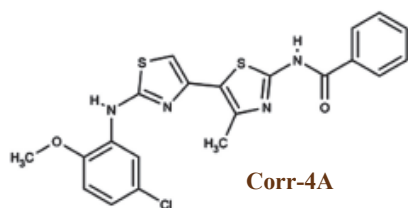
homozygotes pour la mutation F508del, le 4-PBA n'a que partiellement augmenté le transport ionique transépithélial dépendant du CFTR (Rubenstein et Zeitlin, 1998, Zeitlin *et al.*, 2002). La molécule Corr-4a (Pedemonte *et al.*, 2005) permettrait, quant à elle, de réduire significativement la liaison de Hsc70 au NBD1-F508del (~30 %), mais pour de fortes concentrations (50 micromolaire, μM) (Scott-Ward et Amaral, 2009). Ces données encouragent la recherche de *régulateurs de la protéostasie* toujours plus efficaces. Peuvent être cités l'apoptozole (Cho *et al.*, 2011), un alcaloïde quinolizidine nommé matrine (Basile *et al.*, 2012) ou encore l'immunosuppresseur déoxyspergualine (DSG) (Jiang *et al.*, 1998, Norez *et al.*, 2008b), qui tous ciblent Hsc70.

La geldanamycine, un antibiotique de la famille des ansamycines, est pour sa part un inhibiteur spécifique de Hsp90. Cependant, les bénéfices qu'elle apporterait aux patients sont encore discutés. Des investigations supplémentaires concernant son rôle dans la maturation de la protéine CFTR mutée se révèlent nécessaires (Loo *et al.*, 1998, Fuller et Cuthbert, 2000, pour revue : Chanoux et Rubenstein, 2012).

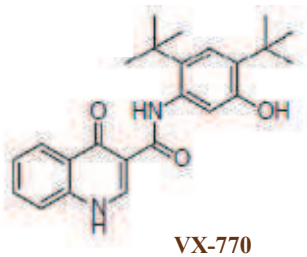
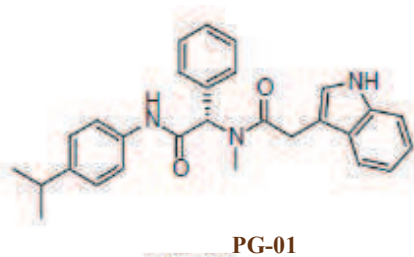
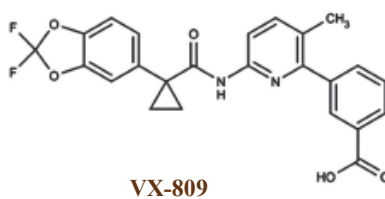
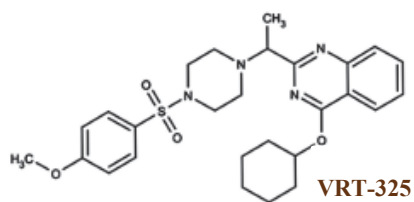
Des molécules perturbant le « cycle de la calnexine » ont aussi été identifiées et à ce titre, peut être cité l'exemple du miglustat (Zavesca®) ou NB-DNJ (*N-butyldeoxynojirimycin*). L'équipe de F. Becq a montré que cet inhibiteur de l'alpha-1,2- glucosidase perturbait l'interaction entre la CNX et le CFTR-F508del, lui permettant d'échapper à la voie de l'ERAD et de poursuivre sa maturation dans l'appareil de Golgi (Norez *et al.*, 2006a). Des cellules épithéliales nasales CF traitées chroniquement avec le miglustat (100 μM) présentent une correction progressive et stable du CFTR-F508del (Norez *et al.*, 2009). De plus, parallèlement à la restauration d'une conductance Cl^- dépendante du CFTR, le miglustat limite l'hyperabsorption des ions Na^+ (Noël *et al.*, 2008) et régule l'homéostasie calcique (Antigny *et al.*, 2008a). Des effets très intéressants ont également été observés chez un modèle souris *Cftr*^{F508del/F508del}. Suite à l'instillation nasale d'une faible dose de miglustat (de l'ordre du picomolaire, pM), une normalisation des conductances Na^+ et Cl^- a été observée (Lubamba *et al.*, 2009). Au vu de ces données encourageantes, la molécule miglustat a fait l'objet de plusieurs essais cliniques, qui n'ont malheureusement pas confirmé ces résultats prometteurs.

Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs de pompes calciques, comme la pompe SERCA, représente aussi une piste intéressante. En effet, l'activité de nombreux chaperons moléculaires impliqués dans la rétention des protéines incorrectement repliées dans le RE est régulée par le calcium. C'est notamment le cas de la CNX. Parmi ces composés sont retrouvés : l'acide cyclopiazonique (CPA), le 2',5'-di(ter-butyl)-1,4-benzohydroquinone (DBHQ), le curcumin (Egan *et al.*, 2004) ou encore la thapsigargine (Tg). En diminuant et en maintenant un faible taux de calcium dans le RE, ces molécules altèrent l'interaction entre le CFTR-F508del et certains chaperons Ca^{2+} -dépendants (Egan *et al.*, 2002, Norez *et al.*, 2006a).

Il est important de remarquer que la modulation de l'expression et de l'activité de ces chaperons n'est pas anodine. Même si de telles modulations influencent positivement le trafic du CFTR-F508del dans les cellules épithéliales, leur expression ubiquitaire et les fonctions qu'elles exercent dans toutes les cellules laissent entrevoir de nombreuses conséquences négatives (pour revues : Chanoux et



CORRECTEURS



POTENTIATEURS

Figure 34 : Structures chimiques de correcteurs et potentiateurs identifiés lors de criblages à haut débit

d'après les revues de Molinski et al., 2012 et de Lukacs et Verkman, 2012

Rubenstein, 2012, Lukacs et Verkman, 2012). De plus, les fortes concentrations requises et la toxicité potentielle de certaines de ces molécules limitent leur utilisation thérapeutique.

c. Les correcteurs qui interagissent directement avec le CFTR-F508del

Le correcteur Corr-4a (**Figure 34**), un dérivé bisaminomethylbithiazole, a été identifié lors d'un criblage à haut débit d'une librairie de 150 000 composés (Pedemonte *et al.*, 2005). Les études initiales démontrent qu'une incubation de 12 à 24 heures (à 37°C) avec le Corr-4a améliore l'expression apicale du CFTR-F508del, conduisant à une élévation de la conductance Cl⁻ (de l'ordre de 8 % de celle observée pour le canal sauvage). En plus de perturber la liaison de Hsc70 au NBD1-F508del, d'autres mécanismes d'action ont été identifiés, comme la promotion du processus de repliement (Loo *et al.*, 2008, Grove *et al.*, 2009), la restauration de l'interaction interdomaines TMD1/TMD2 (Loo *et al.*, 2009) et l'altération de l'ubiquitination (Jurkuvenaite *et al.*, 2010). Toutefois, l'interaction directe entre le composé Corr-4a et le CFTR-F508del reste discutée. Enfin, des analyses de profil d'expression de gènes rapportent qu'un traitement avec le Corr-4a n'altère pas significativement le transcriptome cellulaire, suggérant une action assez spécifique de ce composé (Sondo *et al.*, 2011).

Le composé VRT-325 (**Figure 34**), une quinazoline, est la première molécule correctrice pour laquelle une action via une interaction directe avec le CFTR a été rapportée sans ambiguïté, faisant du VRT-325 un véritable *chaperon pharmacologique* (Kim Chiaw *et al.*, 2010). Comme beaucoup de correcteurs de première génération, le VRT-325 ne corrige que partiellement le processus de repliement du CFTR-F508del, en stabilisant certains domaines individuels (NBD1) et certaines interfaces interdomaines (Loo *et al.*, 2009, Yu *et al.*, 2011). Ceci limite l'efficacité de ce correcteur dans la restauration du transport intracellulaire du CFTR-F508del à la surface cellulaire (Van Goor *et al.*, 2006). Comme le composé Corr-4a, le VRT-325 ne montre pas d'effet majeur sur le transcriptome cellulaire (Sondo *et al.*, 2011). Par ailleurs, en dépit de son action positive sur le processus de repliement du CFTR, le VRT-325 inhibe, à de fortes concentrations (25 µM), le transport ionique dépendant du CFTR. Cette molécule diminuerait significativement l'activité ATPasique du CFTR en réduisant son affinité pour l'ATP (Kim Chiaw *et al.*, 2010).

Le correcteur RDR1 (**Figure 34**), un dérivé phénylhydrazone, a été identifié lors d'un criblage à haut débit développé sur un domaine isolé du CFTR, à savoir NBD1 (Carlile *et al.*, 2007). C'est actuellement le seul *chaperon pharmacologique* pour lequel le domaine cible est identifié, bien qu'il reste encore à déterminer les résidus impliqués dans cette interaction. Les différents tests biochimiques et électrophysiologiques conduits par le groupe de D.Y. Thomas dans différents modèles (systèmes d'expression hétérologues, cellules polarisées, souris génétiquement modifiées) rapportent que RDR1 : i) améliore la thermostabilité du NBD1-F508del murin, ii) augmente la maturation de la protéine CFTR-F508del humaine et iii) restaure une conductance Cl⁻ (*in vitro* dans des cellules exprimant le CFTR-F508del humain et *in vivo* chez le modèle murin) (Sampson *et al.*, 2011).

Un autre correcteur mis en lumière est le VX-809 (**Figure 34**). Peu de choses sont connues sur ses mécanismes d'action et sur les interactions moléculaires entre ce composé et le CFTR-F508del

mais les effets observés *in vitro* se révèlent particulièrement prometteurs. À des concentrations de l'ordre du nM, le VX-809 s'avère être un correcteur hautement spécifique et efficace, permettant de restaurer une sécrétion Cl⁻ à hauteur de 15 % de celle observée pour des cellules épithéliales bronchiques humaines non-CF (Van Goor *et al.*, 2011). Le CFTR-F508del corrigé avec le VX-809 exhibe des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles similaires au CFTR normal, notamment en termes de résistance à la protéolyse de la protéine entière, de temps de séjour dans la membrane plasmique et de Po (Van Goor *et al.*, 2011). Néanmoins, utilisés chez des patients adultes homozygotes pour la mutation F508del, le VX-809 conduit à une normalisation des courants Cl⁻ uniquement au niveau des glandes sudoripares (Clancy *et al.*, 2011).

Une nouvelle cible thérapeutique potentielle révélée récemment, est le site d'interaction entre la kératine 8 (K8) et la protéine CFTR-F508del. La perturbation de cette liaison physique entraîne l'adressage du CFTR muté à la membrane, comme en témoigne l'augmentation des sécrétions ioniques AMPc-dépendantes observée suite à l'utilisation de siRNA-K8 dans les cellules HeLa transfectées avec le CFTR-F508del (Colas *et al.*, 2012). Dans le prolongement de ces travaux, un criblage informatique a conduit à l'identification de douze composés susceptibles d'interagir avec la version mutée du NBD1 et d'agir comme des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine. Deux de ces molécules présentent un fort potentiel thérapeutique. En effet, elles permettent d'augmenter de manière significative le transport ionique médié par le canal CFTR dans i) les cellules HeLa transfectées avec le CFTR-F508del, ii) des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques humaines CF et iii) l'épithélium nasal de souris homozygotes pour la mutation F508del. De façon intéressante, ces deux correcteurs exerceraient leur action en perturbant l'interaction entre la K8 et le CFTR-F508del (Odolczyk *et al.*, 2013).

7.1.3. Identification de potentiateurs améliorant l'activité des protéines CFTR mutées présentant un défaut fonctionnel : mutations de **classe II** et **classe III**

La restauration seule du transport du CFTR-F508del à la membrane apicale n'est pas suffisante pour prétendre améliorer convenablement le transport ionique transépithélial chez les malades. Ainsi, à côté de l'identification de correcteurs toujours plus efficaces, de nombreux efforts ont été entrepris pour découvrir des composés capables d'améliorer spécifiquement l'activité du canal. De tels composés sont appelés potentiateurs. Pour une grande majorité d'entre eux, ils exercent leur action en interagissant directement avec le CFTR au niveau des NBDs, modulant leur dimérisation ou augmentant la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (Vergani *et al.*, 2005, Sampson *et al.*, 2011)

Avant la mise en place du criblage à haut débit, la communauté scientifique disposait déjà d'un bon nombre de molécules capables de stimuler, d'augmenter l'activité canal chlorure du CFTR telles que la forskoline (Fsk) ou des molécules de la classe des xanthines, flavonoïdes, benzimidazoles et dihydropyridines (pour revue : Lukacs et Verkman, 2012). La Fsk, principe actif extrait de la plante *Coleus forskohli*, est une molécule très utilisée lors des études, *in vitro*, d'activité du canal CFTR. Cet activateur de l'AC conduit à une élévation du taux d'AMPc intracellulaire, laquelle promeut l'activation de la PKA. Dans le but de maintenir des concentrations suffisantes en AMPc, des composés limitant

sa dégradation peuvent être employés. Parmi ces inhibiteurs de PDEs sont retrouvés : des xanthines comme l'IBMX (Drumm *et al.*, 1991), des drogues telles l'amrinone et le milrinone ou encore le sildénafil (inhibiteur de la PDE5) (Cobb *et al.*, 2003). De la même façon, l'utilisation d'inhibiteurs de phosphatases, comme l'acide okadaïque ou la calyculine, conduit à prolonger l'état actif du canal en limitant sa déphosphorylation (Luo *et al.*, 1998). Certaines xanthines et certains flavonoïdes sont quant à eux capables d'interagir directement avec le CFTR (au niveau des NBDs) et d'améliorer sa Po. C'est notamment le cas du composé CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) et de la génistéine (Gst) (Illek *et al.*, 1995, French *et al.*, 1997).

Par la suite, les efforts développés par de nombreux groupes de recherche et l'utilisation du criblage à haut débit ont conduit à l'identification de nouveaux potentiateurs (**Figure 34**). À titre d'exemple, le composé phénylglycine PG-01, administré en combinaison avec un agoniste de l'AMPc, stimule la conductance Cl⁻ dépendante du CFTR-F508del et restaure une Po sensiblement équivalente à celle observée pour le canal sauvage (pour revue : Lukacs et Verkman, 2012).

Le composé pyrazole VX-770 conduit à une normalisation des sécrétions Cl⁻ et Na⁺ dans des cellules épithéliales bronchiques issues de patients hétérozygotes G551D/F508del. Interagissant directement avec le CFTR, ce potentiateur augmente la Po des canaux CFTR-G551D et CFTR-F508del (Van Goor *et al.*, 2009, Eckford *et al.*, 2012). Le VX-770 (Kalydeco™, Ivacaftor) a obtenu, en janvier 2012, l'approbation par la FDA pour les malades âgés de plus de 6 ans porteurs de la mutation G551D. Les patients traités montrent une amélioration de la fonction pulmonaire, un gain de poids, une normalisation des sécrétions sudorales et sont moins sujets aux exacerbations pulmonaires (Ramsey *et al.*, 2011). Les malades pouvant espérer un réel bénéfice thérapeutique avec cette molécule sont au final assez peu nombreux, la fréquence de la mutation G551D dépassant à peine le seuil de 1 %. Néanmoins, le VX-770 constitue un réel espoir et fait l'objet de nombreuses études cliniques. Une partie de celles-ci évaluent l'efficacité et la tolérance de sa combinaison avec des correcteurs comme les composés VX-809 ou VX-661, chez des patients homozygotes pour la mutation F508del (sources : <http://www.cff.org/research/DrugDevelopmentPipeline/>).

7.1.4. Thérapies combinées et molécules à double activité : mutations de **classe II**

a. Combinaison de molécules actives

Au vu de l'efficacité limitée d'un grand nombre des correcteurs identifiés, plusieurs auteurs ont proposé une utilisation combinée de ces composés. Un traitement alliant les *chaperons pharmacologiques* Corr-4a et VRT-325 conduit à un effet synergique sur le processus de biosynthèse du CFTR-F508del, suggérant des sites de liaison différents sur la protéine mutée (Wang *et al.*, 2007b, Pedemonte *et al.*, 2010). Afin de pallier les multiples défauts engendrés par la mutation F508del, des approches thérapeutiques s'orientent vers un traitement « correcteur + potentiateur ». Bien que les premiers résultats de ces bithérapies semblent prometteurs, il faut néanmoins rester prudent dans la mise en place de telles stratégies. Celles-ci impliquent l'utilisation de molécules de haute spécificité, ne ciblant que la protéine CFTR défectueuse, afin de limiter l'apparition d'effets inattendus. De plus,

un traitement avec deux molécules pourrait donner lieu à des interactions médicamenteuses aux conséquences néfastes et augmenter les problèmes de toxicité (pour revue : Molinski *et al.*, 2012).

b. Molécules à double activité

L'idéal serait bien évidemment d'identifier des composés possédant une double, voire une triple compétence (trafic, activité, stabilité). À ce jour, peu des molécules identifiées lors des criblages présentent cette particularité (Sheppard, 2011).

C'est toutefois le cas du potentiateur VRT-532 (Van Goor *et al.*, 2006), qui corrige également spécifiquement l'adressage défectueux du CFTR-F508del. Cependant son activité correctrice est assez faible et ne permet pas de restaurer significativement la protéine mutée à la surface cellulaire. C'est aussi le cas des *chaperons pharmacologiques* RDR1, VRT-325 et Corr-4a. Alors que RDR1 possède une faible activité potentiatrice (Sampson *et al.*, 2011), VRT-325 et Corr-4 améliorent la stabilité du rCFTR-F508del à la surface cellulaire (Varga *et al.*, 2008). Les aminoarylthiazoles (AATs), tels que le composé EN177I (Pedemonte *et al.*, 2011), ainsi que certains composés MPB possèdent également cette particularité (Becq *et al.*, 1999, Galletta *et al.*, 2001). En plus de moduler positivement l'activité du CFTR (wt, G551D et F508del), la liaison de certains MPB au CFTR-F508del limiterait sa dégradation protéasomale, favorisant ainsi sa relocalisation à la surface des cellules épithéliales (Norez *et al.*, 2008a). De façon intéressante, Mills et associés décrivent la synthèse d'une molécule hybride composée du correcteur Corr-4a et du potentiateur PG-01, séparés par un lien hydrolysable. En conditions physiologiques, le clivage de cette molécule hybride par les enzymes intestinales permet la libération des deux composés, pouvant alors aller exercer leurs actions respectives (Mills *et al.*, 2009).

7.2. Autres stratégies thérapeutiques

7.2.1. La thérapie génique

Suite au clonage du gène responsable de la maladie, la thérapie génique de la mucoviscidose a suscité un grand intérêt au sein de la communauté scientifique. Initialement pleine d'espoir pour les malades et malgré des efforts intenses, cette stratégie se révèle malheureusement décevante. Les bénéfices cliniques rapportés à ce jour restent très faibles.

Pouvant paraître simple aux premiers abords, délivrer une ou plusieurs copies du gène *CFTR* normal au niveau des poumons se révèle plus difficile qu'il n'y paraissait au départ (pour revue : Griesenbach et Alton, 2012). Le transfert de l'acide déoxyribonucléique complémentaire (ADNc) du *CFTR* dans l'épithélium respiratoire se heurte à de nombreuses difficultés, dont l'identification de vecteurs efficaces. Les vecteurs biologiques viraux, comme les adénovirus ou les virus adéno-associés (AAV, *adeno-associated virus*), permettent d'incorporer le gène *CFTR* de manière efficace dans les cellules épithéliales respiratoires, mais présentent le gros désavantage de déclencher une réponse immunitaire anti-virale. Toutefois, il a été suggéré que les lentivirus seraient en mesure d'échapper au système immunitaire, permettant l'administration répétée et une expression stable du gène au cours du temps. Ces virus ouvrent de nouvelles portes pour l'utilisation de vecteurs

viraux dans le cadre de la thérapie génique de la mucoviscidose (pour revue : Griesenbach et Alton, 2012). Une alternative à cela est le développement de vecteurs synthétiques, notamment des lipides (liposomes), qui présentent une toxicité et une immunogénicité moindres que les vecteurs viraux. Cependant, leur efficacité de transfert est plus faible et les complexes ADN-lipides ne sont pas très stables.

7.2.2. Modulation des voies de transport ionique parallèles

Des approches autres que la restauration d'une sécrétion Cl^- médiée par le canal CFTR peuvent être mises en place pour rééquilibrer le transport ionique transépithélial et retrouver un niveau d'hydratation correcte de l'ASL chez les malades.

Actuellement, les traitements visant à améliorer la clairance mucociliaire au niveau de l'épithélium respiratoire incluent l'inhalation d'une solution saline hypertonique ou d'agents osmotiques comme le mannitol. Une autre stratégie à visée plus curative est basée sur la modulation des voies de transport ionique parallèles. De nombreux efforts sont entrepris dans le but d'identifier des composés réduisant l'absorption d'électrolytes médiée par les canaux sodiques (inhibiteurs des ENaCs) ou stimulant la sécrétion Cl^- non dépendante du CFTR (activateurs des CaCCs). Cette dernière permettrait de compenser le défaut de sécrétion Cl^- engendré par le défaut fonctionnel et/ou la présence en quantité réduite du canal CFTR muté à la surface des épithélia mucoviscidosiques.

Plusieurs molécules capables de stimuler un transport d'ions Cl^- via l'activation des CaCCs ont été identifiées. C'est le cas du Moli 1901, dont les résultats pourtant prometteurs (Zeitlin *et al.*, 2004, Grasemann *et al.*, 2007) n'ont pas été confirmés lors de l'étude clinique de phase II terminée en août 2009. Il en est de même pour la molécule Denufosol, un agoniste des récepteurs P2Y_2 , qui montrait des résultats pourtant très encourageants depuis les essais cliniques débutés en 2005 (Deterding *et al.*, 2005, Ratjen *et al.*, 2012). Une autre molécule mise en exergue lors d'un criblage à haut débit est la guanabenz (Wytensin®). Cet agoniste des récepteurs α -2 adrénergiques augmente la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} via la stimulation d'un influx calcique dans les cellules épithéliales nasales JME-CF15. Ceci permet l'activation des CaCCs et la restauration d'une sécrétion Cl^- (Norez *et al.*, 2008c). Malgré certaines désillusions récentes, l'utilisation de composés capables de stimuler cette voie de transport ionique parallèle reste une alternative intéressante. Toutefois, un élément important à considérer dans la mise en place d'une telle stratégie, est l'activité CaCC que pourrait présenter le canal CFTR dans certains épithélia (pour revue : Billet et Hanrahan, 2013).

8. Conclusion : le CFTR, toujours en quête de protéines partenaires

L'identification de nouveaux partenaires de la protéine CFTR constitue une part importante de la recherche sur la mucoviscidose. L'interactome du CFTR ne cesse de s'agrandir et de fournir de précieuses informations permettant de mieux appréhender les multiples étapes de sa biosynthèse et de son transport intracellulaire. De plus, l'étude de ces interactions protéine-protéine permet

également de parfaire les connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'activité du canal ionique lorsque celui est inséré dans la membrane apicale.

La décortication des divers complexes protéiques dans lequel le CFTR est engagé, que ce soit dans le RE, le compartiment post-golgien et à la membrane apicale, s'avère essentielle pour découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux partenaires du CFTR, une interaction directe entre le canal ionique et la protéine annexine A5 a été mise en évidence dans notre laboratoire. Il a été montré que ce lien physique s'établissait via NBD1. De plus, soulevant la pertinence physiologique de cette découverte, une codistribution (partielle) des deux protéines a été observée dans la région apicale de cellules épithéliales bronchiques humaines (coupes tissulaires). Une connexion fonctionnelle entre les deux protéines a également été établie. En effet, la sécrétion ionique dépendante du CFTR apparaît corrélée au niveau d'expression intracellulaire de l'annexine A5. Enfin, une hausse des courants médiés par le CFTR (stimulés par un cocktail Fsk/IBMX) ainsi qu'une augmentation de la quantité de canaux dans la membrane plasmique ont été observées suite à la surexpression de l'annexine A5 dans des cellules exprimant le CFTR-F508del (Trouvé *et al.*, 2007, Le Drévo *et al.*, 2008). Au vu de telles observations, l'annexine A5 apparaît comme une cible potentielle pour la correction de certains défauts engendrés par la mutation F508del. Une piste thérapeutique pourrait être l'identification de molécules capables d'augmenter son expression dans des cellules épithéliales exprimant le mutant F508del de la protéine CFTR.

Partie 3. Les annexines

Les annexines forment une famille de protéines liant le calcium, pour lesquelles de nombreuses propriétés sont décrites mais qui ne possèdent pas encore de fonction(s) biologique(s) bien définie(s). Elles apparaissent impliquées dans de multiples processus cellulaires souvent, mais pas seulement, reliés aux membranes. Cela s'explique par leur capacité à se lier aux phospholipides membranaires de manière dépendante du calcium.

Les annexines A1 et A2 restent, à ce jour, les annexines les plus étudiées et les mieux caractérisées. L'annexine A5 est également très présente dans la littérature. Sa région N-terminale limitée à quelques acides aminés fait d'elle la plus petite des annexines, constituant ainsi un excellent modèle pour la compréhension de leur comportement de liaison aux membranes. Une autre raison de sa popularité est son utilisation comme marqueur quasi universel de l'apoptose.

Aucune maladie humaine incriminant comme cause principale des mutations dans les gènes codant les annexines n'a encore été décrite. Cependant, de nombreuses observations tendent à souligner l'importance physiologique de cette famille de protéines. Il apparaît que des modifications dans le niveau d'expression, la localisation ou encore la fonction de certaines annexines peuvent contribuer à la physiopathologie de certaines maladies (pour revues : Gerke et Moss, 2002, Hayes et Moss, 2004). Cela a notamment été observé dans le cadre de maladies cardiovasculaires, inflammatoires et certains cancers.

Dans des cas bien particuliers, pour lesquels des dérégulations dans le niveau d'expression ou la fonction des annexines s'avèrent fondamentalement responsables de l'état pathologique, certains auteurs ont introduit le terme d'*annexinopathies*. Peut être cité le groupe de J.H. Rand, lequel a corrélé certaines anomalies liées aux annexines A2 et A5 avec des désordres de la coagulation (pour revues : Rand, 2000, Hayes et Moss, 2004).

1. Présentation générale : découverte, définition et nomenclature

Le terme annexine, proposé en 1990, provient du mot grec « annex » qui signifie « faire tenir ensemble ». Il a été choisi pour décrire la propriété principale des annexines qui est de se lier à et de maintenir ensemble certaines structures biologiques, en particulier les membranes.

Lors de leur découverte dans les années 1970-1980, des noms très variés leur ont été attribués, se référant le plus souvent à leurs propriétés. Des termes tels que synexines (Creutz *et al.*, 1978), lipocortines (Flower, 1986), chromobindines (Creutz *et al.*, 1983), calcimedines (Moore *et al.*, 1984), calpactines (Glenney *et al.*, 1987) ou encore anchorines (Mollenhauer *et al.*, 1984) étaient alors employés par la communauté scientifique. Par la suite, l'identification de caractéristiques communes a permis de regrouper ces différentes protéines au sein d'une même superfamille (pour revues : Crompton *et al.*, 1988, Gerke et Moss, 2002). Pour pouvoir prétendre être une annexine, une protéine doit remplir deux conditions majeures : i) lier les phospholipides de manière calcium-dépendante, préférentiellement les phospholipides acides constitués d'une ou plusieurs charges négatives,

Tableau IV : Nomenclature de la superfamille des annexines

Name	Synonyms/Former name(s)	Human gene symbol	Non-human gene symbol		
annexin A1	lipocortin 1, annexin I	ANXA1	Anxa1		Vertébrés (famille A)
annexin A2	calpactin 1, annexin II	ANXA2	Anxa2		
annexin A3	annexin III	ANXA3	Anxa3		
annexin A4	annexin IV	ANXA4	Anxa4		
annexin A5	annexin V	ANXA5	Anxa5		
annexin A6	annexin VI	ANXA6	Anxa6		
annexin A7	synexin, annexin VII	ANXA7	Anxa7		
annexin A8	annexin VIII	ANXA8	Anxa8		
annexin A9	annexin XXXI	ANXA9	Anxa9		
annexin A10		ANXA10	Anxa10		
annexin A11	annexin XI	ANXA11	Anxa11		
annexin A12	unassigned				
annexin A13	annexin XIII	ANXA13	Anxa13		
Name	Organism/Former name	Gene symbol			
annexin B9	3 species of insect, annexin IX	Anxb9		Invertébrés (famille B)	
annexin B10	4 species of insect, annexin X	Anxb10			
annexin B11	1 species of insect, annexin	Anxb11			
annexin B12	Cnidaria, annexin XII	Anxb12			
	3 species of flatworms, 5 annexins 10 species of roundworms, 5 annexins (including <i>C.elegans</i> annexins XV-XVII,XXX)				
Name	Organism/Former name	Gene symbol			
annexin C1	<i>Dictyostellium</i> and <i>Neurospora</i> annexin XIV	Anxc1		Champignons (famille C)	
annexin C2-C5	4 species of fungi/ molds/alveolates	Anxc2-c5			
Name	Organism/Former name	Gene symbol			
annexin D1-D25	35 species including annexin XVIII and annexins XXII-XXIX	Anxd1-d25		Plantes (famille D)	
Name	Organism/Former name	Gene symbol			
annexin E1	<i>Giardia</i> annexin XXI	Anxe1		Protistes (famille E)	
annexin E2	<i>Giardia</i> annexin XIX	Anxe2			
annexin E3	<i>Giardia</i> annexin XX	Anxe3			

Selon la nomenclature actuelle, les annexines sont regroupées en 5 familles : la famille A réunit les 12 annexines retrouvées chez les vertébrés, les familles B à E regroupent respectivement les annexines présentes chez les invertébrés, les champignons et les eucaryotes unicellulaires, les plantes et enfin les protistes. Des exceptions peuvent être soulignées : un orthologue de l'annexine A11, normalement non distribuée chez les invertébrés, a été identifié chez l'aplysie (genre *Aplysia*).

d'après les revues de Gerke et Moss, 2002 et de Moss et Morgan, 2004

et ii) présenter une séquence possédant une répétition, quatre ou huit fois selon le membre de la famille, d'un segment conservé de 70 acides aminés, nommé « répétition annexine » ou « domaine annexine ».

Plus de 160 annexines ont été identifiées à ce jour, réparties dans plus de 65 espèces différentes. Elles sont présentes dans de très nombreux organismes du règne vivant mais ne sont cependant pas retrouvées chez les bactéries. La nomenclature actuelle classe les annexines (Anx) selon 5 grandes familles (**Tableau IV**) : les annexines de la famille A sont spécifiques aux vertébrés (AnxA1 à AnxA13, la nomenclature A12 n'a pas été référencée). Les annexines présentes chez les invertébrés constituent la famille B (AnxB1 à AnxB14). La famille C regroupe les annexines de champignons et de certains eucaryotes unicellulaires (AnxC1 à AnxC9). Les annexines de plantes forment la famille D (AnxD1 à AnxD25). Enfin, les annexines de la famille E sont retrouvées chez les protistes (AnxE1 à AnxE7) (pour revue : Moss et Morgan, 2004).

Entre 40 et 60 % d'homologie sont retrouvés entre les 160 protéines identifiées, qui dérivent toutes d'un même gène ancestral depuis 1,2 milliard d'années. La présence de huit segments répétés au lieu de quatre observée pour l'AnxA6 s'expliquerait par la duplication de ce gène (pour revue : Crompton, 1988). Ce haut degré d'homologie peut facilement s'expliquer par la forte conservation du « cœur » des annexines. Le domaine N-terminal beaucoup plus variable serait, quant à lui, responsable de la spécificité fonctionnelle de chaque protéine.

Chez l'Homme, les 12 membres de la famille A sont codés par 12 gènes différents. Ces derniers présentent des tailles très variables allant de 15 kb (*anxA9*) à 96 kb (*anxA10*) (pour revue : Moss et Morgan, 2004).

2. Structure et propriétés des annexines

2.1. Structure des annexines de vertébrés

Deux domaines principaux composent les annexines : le domaine conservé C-terminal, appelé « cœur » de l'annexine, et le domaine variable localisé en position N-terminale de la protéine. Les analyses moléculaires et cristallographiques ont établi la structure générale des annexines et ont permis l'élaboration de modèles de liaison à la membrane. Dès 1990, Huber et collaborateurs proposent la première structure cristalline d'une annexine : celle de l'AnxA5 humaine. Son domaine N-terminal limité à quelques acides aminés en fait la plus petite des annexines (Huber *et al.*, 1990).

2.1.1. Le domaine C-terminal : « cœur » de l'annexine

a. Généralités

Ce « cœur » est composé de quatre régions homologues répétées (huit dans le cas de l'AnxA6) d'environ 70 acides aminés. Chaque répétition est structurée en cinq hélices α (A-E) connectées par des boucles et présente un ou plusieurs sites de liaison aux ions Ca^{2+} , dont la séquence est

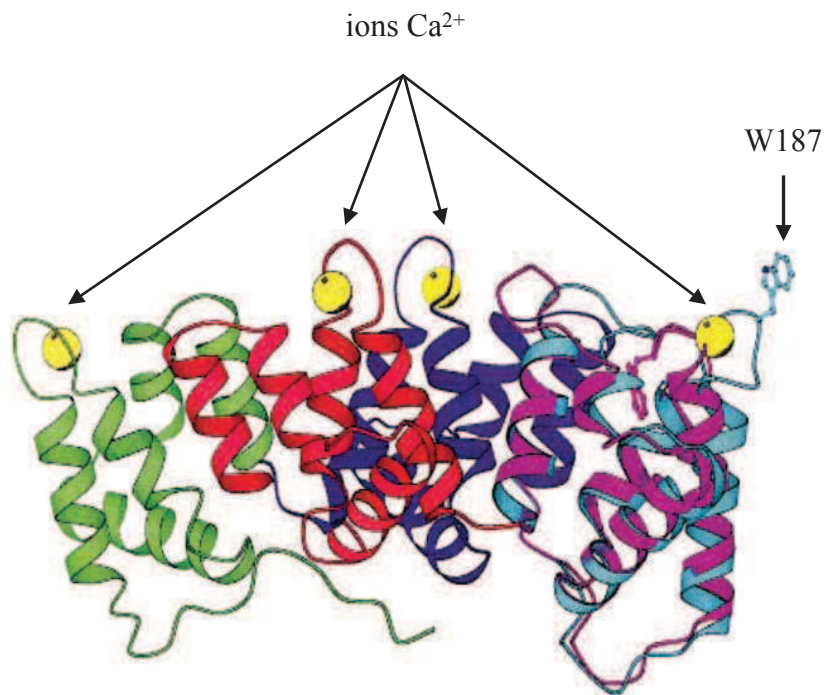


Figure 35 : Représentation tridimensionnelle de l'annexine A5

Les quatre domaines répétés du « cœur » de l'AnxA5 sont représentés chacun dans une couleur différente : répétition I (vert), répétition II (violet), répétition III (rose/bleu, en fonction de la concentration en ions Ca^{2+}), répétition IV (rouge). Les ions Ca^{2+} apparaissent ici sous la forme de sphères jaunes. L'AnxA5 compte quatre sites de liaison aux ions Ca^{2+} (un site par répétition), localisés sur la face convexe, permettant la liaison avec les phospholipides membranaires. La région N-terminale (vert) longe la face concave de la molécule. La concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} induit un changement de conformation du domaine III ($[\text{Ca}^{2+}]$ faible : rose, $[\text{Ca}^{2+}]$ élevée : bleu) conduisant à l'exposition du tryptophane 187 (W187).

AnxA5 : annexine A5, Ca^{2+} : ion calcium

adaptée de la revue de Gerke et Moss, 2002

hautement conservée (Geisow, 1986, Huber *et al.*, 1990). La structure tridimensionnelle du « cœur » est, elle aussi, particulièrement bien conservée. Les études cristallographiques ont mis en évidence une organisation en super-hélice des quatre répétitions homologues (**Figure 35**), formant ainsi une structure plane et légèrement incurvée. Les sites de liaison aux ions Ca^{2+} et aux phospholipides sont retrouvés sur le côté convexe, qui s'oriente du côté membranaire. Les ions Ca^{2+} jouent ici un rôle de pont et coordonnent les interactions entre la protéine et les régions phosphoryles de la membrane phospholipidique (Sopkova *et al.*, 1993, Swairjo *et al.*, 1995). Faisant face au cytosol, le côté concave peut, quant à lui, interagir par liaison hydrophobe avec le domaine N-terminal de la protéine mais également avec différents partenaires cytosoliques (pour revues : Raynal et Pollard, 1994, Gerke et Moss, 2002).

b. Les sites de liaison aux ions calcium

La littérature décrit les annexines comme une famille de protéines liant les ions Ca^{2+} . Cependant, leur affinité pour cet ion en absence de phospholipides est relativement faible. Il est à noter que les quatre domaines répétés de la protéine ne lient pas les ions Ca^{2+} de la même manière. Des études de cristallographie et de mutagenèse dirigée ont permis de définir avec précision le nombre, le type et la localisation des sites de liaison aux ions Ca^{2+} . Deux types de sites ont été identifiés chez les annexines : des sites de type II, de forte affinité pour les ions Ca^{2+} , et d'autres de type III, de moindre affinité (Huber *et al.*, 1990, Jost *et al.*, 1994). Ces deux types de sites de liaison diffèrent tout à fait de celui de type I, au motif « Main-EF ». Même si les annexines présentent une grande similarité dans la structure générale de leur « cœur », le nombre et l'organisation des sites de liaison aux ions Ca^{2+} n'est pas identique pour tous les membres de la famille. Quatre sites de liaison (types II et III) ont été rapportés pour l'AnxA5, répartis sur chacune des « répétitions annexine » (**Figure 35**), cinq pour l'AnxA2 et six pour l'AnxA1 (Huber *et al.*, 1990, Jost *et al.*, 1992, Weng *et al.*, 1993, Jost *et al.*, 1994). Ces variations dans le nombre et la répartition des sites de liaison aux ions Ca^{2+} pourraient être à l'origine des différences observées entre les annexines dans leur sensibilité au calcium et dans leur spécificité à certains phospholipides (Jost *et al.*, 1994, pour revues : Raynal et Pollard, 1994, Gerke *et al.*, 2005).

2.1.2. Le domaine N-terminal : propre à chaque annexine

a. Généralités

À la différence du domaine C-terminal, la région N-terminale présente une grande variabilité entre les membres de la famille, tant en termes de longueur que de séquence et d'organisation (**Figure 36**), laquelle permettrait d'expliquer la spécificité individuelle des annexines.

En l'absence de calcium, le domaine N-terminal est replié en une unité structurale distincte et associé, via des interactions hydrophobes, à la face concave du « cœur » de l'annexine (pour revues : Swairjo et Seaton, 1994, Liemann et Lewit-Bentley, 1995). La liaison d'ions Ca^{2+} sur le côté convexe pourrait induire un changement de conformation dans la structure de l'annexine. Celui-ci conduirait à la présentation du domaine N-terminal à la portion cytosolique de la cellule, où il deviendrait accessible pour d'autres interactions (pour revues : Gerke et Moss, 2002, Gerke *et al.*, 2005).

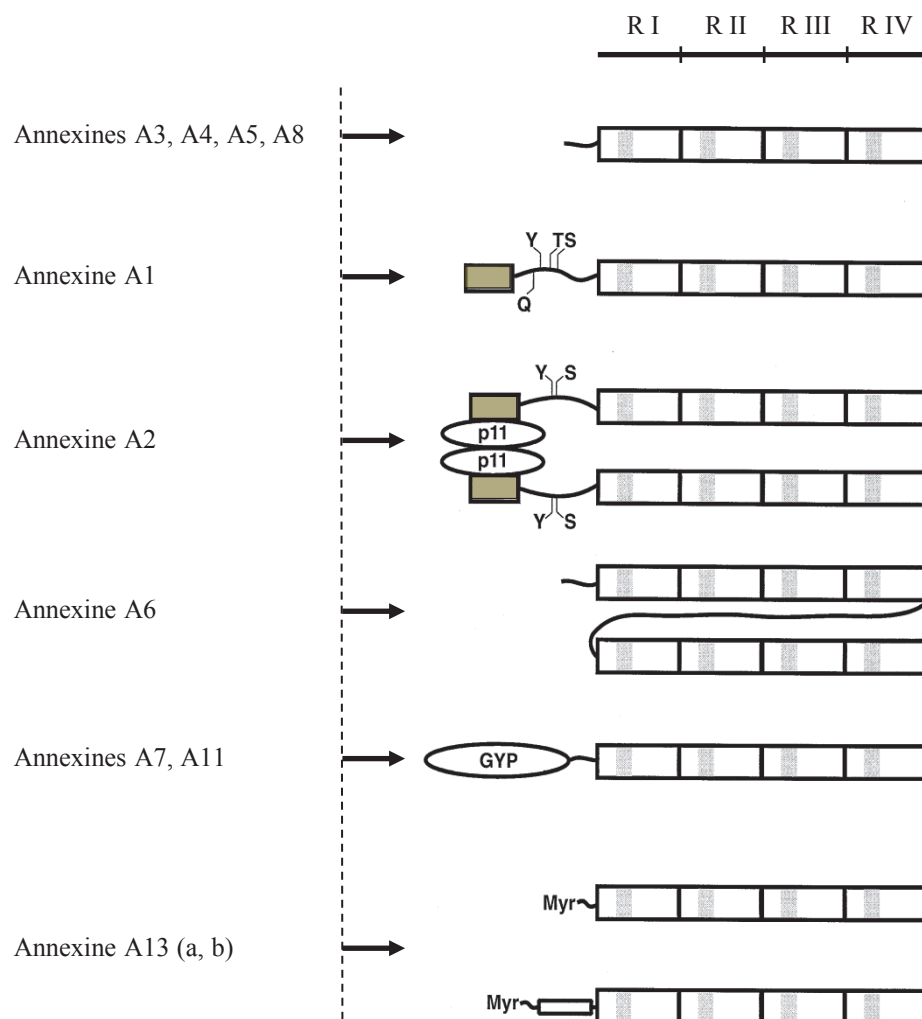


Figure 36 : Organisation structurale des annexines de vertébrés

Les annexines de vertébrés sont classées selon les caractéristiques structurales de leur domaine N-terminal, lequel est très variable en longueur : de 12 à 19 résidus (annexines A3, A4, A5, A8) jusqu'à 200 résidus pour l'annexine A11. L'hélice α (schématisée par un rectangle marron) formée par le domaine N-terminal des annexines A1 et A2 permet leur liaison aux protéines S100. Ces deux membres présentent également plusieurs résidus potentiellement phosphorylables [sérine (S), thréonine (T) ou tyrosine (Y)], mais seule l'AnxA1 possède un site de transglutamination (Q). Les annexines A7 et A11 sont caractérisées par un long domaine N-terminal riche en glycine, tyrosine et proline (GYP). L'AnxA13, seule annexine sujette à la myristoylation (Myr), présente deux variants d'épissage (a et b).

Anx : annexine, Ca^{2+} : ion calcium, GYP : région riche en glycine-tyrosine-proline, Myr : myristoylation, RI, RII, RIII, RIV : « répétition annexine » I à IV

adaptée de la revue de Gerke et Moss, 1997

b. Le domaine N-terminal : siège de modifications post-traductionnelles

La région N-terminale de certaines annexines, et notamment les annexines A1 et A2, a été identifiée, *in vitro* et *in vivo*, comme substrat majeur de l'activité tyrosine kinase associée au récepteur à l'EGF (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) et de la protéine tyrosine kinase pp60^{v-src}. Des sites de phosphorylation par la PKC ont également été décrits pour la plupart des annexines (pour revues : Creutz, 1992, Gerke et Moss 1997, Rothhut, 1997). L'AnxA1 a aussi été rapportée comme substrat, *in vitro*, de la PKA, avec un unique site de phosphorylation situé en dehors du domaine N-terminal de l'annexine (Varticovski *et al.*, 1988).

La phosphorylation affecte certaines propriétés des annexines, en particulier leur affinité de liaison pour les ions Ca²⁺ et les phospholipides (pour revues : Raynal et Pollard 1994, Gerke et Moss 1997). Dans le cas des annexines A1 et A2, l'agrégation membranaire dépendante du calcium est fortement inhibée par la phosphorylation (Johnstone *et al.*, 1992, Wang et Creutz 1992). L'état de phosphorylation de l'AnxA1 pourrait également modifier son comportement vis-à-vis des phospholipases A₂ (PLA₂). Non phosphorylée, elle les inhibe, alors que phosphorylée elle stimulerait la PLA₂ cytosolique (cPLA₂) (Hayashi *et al.*, 1993, Solito *et al.*, 1998). La phosphorylation des annexines entraîne aussi une susceptibilité modifiée face à la protéolyse. La protéine tronquée obtenue suite au clivage présenterait en retour une sensibilité altérée aux ions Ca²⁺ et aux phospholipides, ainsi qu'une localisation intracellulaire différente (pour revues : Raynal et Pollard 1994, Moss et Morgan 2004).

D'autres modifications post-traductionnelles ont été décrites, notamment pour l'AnxA13 qui est la seule annexine présentant une myristoylation (pour revue : Gerke et Moss 1997) (**Figure 36**). Plus récemment, l'ubiquitination et la sumoylation de l'AnxA1 ont également été démontrées (Shimoji *et al.*, 2009, Hirata *et al.*, 2010).

Enfin, par sa partie N-terminale limitée à quelques acides aminés, aucun site de phosphorylation n'a été décrit pour l'AnxA5 dans cette région. De façon étonnante, l'AnxA5 est capable d'inhiber la phosphorylation *in vitro* des annexines A1 (Shibata *et al.*, 1992, Raynal *et al.*, 1993, Rothhut *et al.*, 1995) et A2 par les PKC conventionnelles (cPKC) (Dubois *et al.*, 1995). Les travaux de Dubois et collaborateurs démontrent que le fort pouvoir inhibant que possède l'AnxA5 sur les cPKC ne serait pas dû à une interaction directe entre les deux protéines. Cela s'expliquerait par la séquestration du substrat phospholipidique par l'AnxA5, telles les phosphatidylsérines (PS), dont l'importance dans l'activation des cPKC n'est plus à démontrer (Dubois *et al.*, 1998).

2.2. Propriétés des annexines de vertébrés

2.2.1. Liaison aux phospholipides membranaires

a. Liaison aux phospholipides dépendante du calcium

Les annexines se définissent comme des protéines solubles et hydrophiles capables de lier les phospholipides en présence d'ions Ca²⁺, en particulier les phospholipides acides portant des charges négatives. À noter que cette interaction est réversible. En effet, la chélation des ions Ca²⁺ par l'ajout

d'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) ou d'EGTA (acide glycol diamine tétra-acétique) entraîne la libération des annexines de la bicouche phospholipidique. Cependant, même si la liaison aux phospholipides est une caractéristique partagée par toutes les annexines, il a été montré que le comportement des membres de cette famille n'est pas similaire face aux membranes. Certaines annexines, notamment les annexines A1 et A2, ont une affinité plus grande pour les lipides. Ceci expliquerait les variations observées entre les annexines pour les besoins en ions Ca^{2+} libres requis pour fixer les différentes têtes polaires des phospholipides. De plus, pour une même annexine, le nombre d'ions nécessaire pour l'interface phospholipide/protéine varie en fonction de l'état d'oligomérisation de la protéine (annexines A1, A2 ou A6) et de la composition en phospholipides acides (Powell et Glenney, 1987, pour revue : Raynal et Pollard, 1994). Toutes présentent une grande affinité pour les phospholipides chargés négativement tels que l'acide phosphatidique (PA), la phosphatidylsérine (PS) ou le phosphatidylinositol (PI). Cependant, en présence de plus fortes concentrations en ions Ca^{2+} , certaines annexines peuvent également se fixer à des phospholipides à têtes polaires neutres comme la phosphatidyléthanolamine (PE).

Le tryptophane W187 de l'AnxA5 (**Figure 35**) a souvent été utilisé dans les études de fluorescence s'intéressant aux interactions annexine/membrane (Meers, 1990, Meers et Mealy, 1993). Les premiers modèles établis suggéraient une insertion calcium-dépendante de ses cycles aromatiques dans le feuillet membranaire, lui permettant ainsi d'ancrer l'AnxA5 à la membrane. Par la suite, la microscopie à force atomique a montré que le domaine répété III n'interagissait pas fortement avec les phospholipides membranaires (Reviakine *et al.*, 1998). D'après certains auteurs, il semblerait que le W187, dont la conformation change en fonction de nombreux paramètres, joue le rôle d'interface avec la membrane mais ne s'y insère pas (Pigault *et al.*, 1999, Sopkova *et al.*, 1999).

L'utilisation de protéines chimériques, contenant le « cœur » C-terminal de différentes annexines fusionné avec la GFP (*green fluorescent protein*), a permis de visualiser la distribution cellulaire et d'identifier les membranes cibles de chacune des annexines dans des cellules vivantes. La membrane plasmique et les membranes impliquées dans les voies de biosynthèse et de l'endocytose apparaissent comme les plus ciblées par ces protéines (Rescher *et al.*, 2000, pour revue : Gerke et Moss, 1997).

Les phospholipides ne sont pas répartis de manière uniforme dans les différents organites cellulaires. Ainsi, la liaison préférentielle d'une annexine avec un certain type de phospholipide lui permettrait d'être associée aux compartiments enrichis en ce lipide. Ceci pourrait expliquer, en partie, les différences de localisation et de rôle de chacun des membres de cette famille (pour revues : Gerke et Moss, 2002, Gerke *et al.*, 2005). Cependant, l'absence du domaine N-terminal dans ces constructions chimériques incite à une certaine prudence. En effet, bien que le « cœur » de l'annexine apporte la spécificité de la liaison membranaire, des études réalisées *in vivo* avec les protéines entières rapportent des distributions souvent différentes par rapport à leur « cœur » respectif. Ces observations confirment l'importance du domaine N-terminal dans la diversité fonctionnelle des annexines. De plus, d'autres facteurs peuvent également influencer le transport et la localisation des

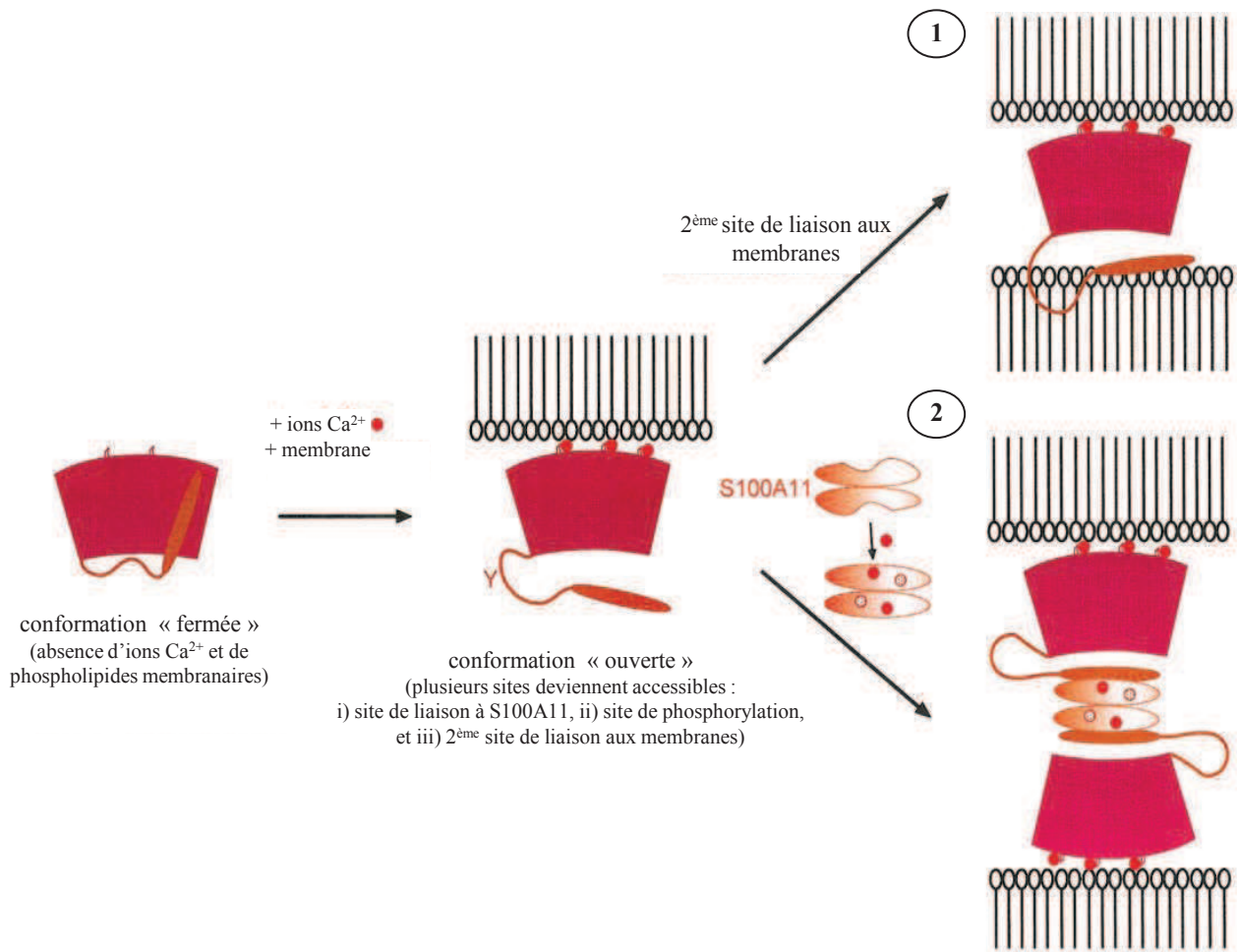


Figure 37 : Modèle décrivant les différentes conformations de l'annexine A1 et l'engagement de son domaine N-terminal dans le phénomène d'agrégation de membranes

En absence de calcium, l'hélice α N-terminale, qui contient un site de liaison à la protéine S100A11 et un site de fixation aux phospholipides membranaires, est repliée et se positionne à l'intérieur du « cœur » de l'AnxA1. Le domaine N-terminal est alors associé à la répétition III où il prend la place de l'hélice D. En présence de calcium et une fois liée à une membrane, un changement de conformation de l'AnxA1 va éloigner l'hélice N-terminale du « cœur » et la rendre plus accessible pour d'autres interactions. Un tel déplacement de l'hélice N-terminale serait un prérequis pour l'activité d'agrégation de membranes. En effet, la mise à disposition d'un 2^{ème} site de liaison aux membranes lui permettrait d'interagir avec une seconde surface membranaire (①). L'hélice α deviendrait également disponible pour lier le dimère S100A11, de manière calcium-dépendante, permettant la formation du tétramère AnxA1-S100A11 (②) et le rapprochement entre deux surfaces membranaires.

AnxA1 : annexine A1, Ca^{2+} : ion calcium

adaptée de la revue de Gerke et Moss, 2002

annexines dans la cellule tels que l'interaction avec des ligands cytosoliques ou certaines modifications post-traductionnelles (Eberhard *et al.*, 2001).

L'interaction des annexines avec les membranes n'est pas sans conséquence pour la structure membranaire. Ces protéines, et notamment l'AnxA5, sont capables de figer les phospholipides auxquels elles sont liées, empêchant ainsi leur diffusion normale dans la bicouche lipidique. L'auto-association des annexines en réseaux bidimensionnels (2D) entraînerait la formation de « clusters » de phospholipides anioniques, qui perturberaient la structure fluide de la membrane (Megli *et al.*, 1998, Cezanne *et al.*, 1999).

b. Agrégation de membranes

La propriété des annexines à agréger des vésicules de transport a été très rapidement reconnue. Dès sa découverte, Creutz *et al.*, montrent que l'AnxA7 permet l'agrégation des vésicules de sécrétion des cellules chromaffines (Creutz *et al.*, 1978, Creutz *et al.*, 1979). Cette activité d'agrégation a été étendue plus tard aux annexines A1, A2, A3, A4 et A6.

Pour expliquer cette activité, une des hypothèses propose que l'association annexine-annexine, liant chacune la membrane d'une vésicule, permettrait cette agrégation (Liu, 1999, pour revues : Creutz, 1992, Raynal et Pollard 1994). Une autre explication est basée sur l'identification d'un site de liaison aux phospholipides dans le domaine N-terminal (acides aminés 24 à 35) de l'AnxA1. Cette séquence s'ajouterait à la face convexe et constituerait ainsi un second site de liaison aux membranes (Bitto et Cho 1998, pour revue : Gerke et Moss 1997). En effet, lorsque celle-ci est fusionnée avec le cœur de l'AnxA5, elle lui confère l'activité d'agrégation de membranes qu'elle ne possède pas normalement (Bitto et Cho, 1999). Cependant, ce second site de fixation ne serait disponible qu'une fois l'AnxA1 liée aux phospholipides membranaires, lorsque le domaine N-terminal devient pleinement accessible (Rosengarth *et al.*, 2001, Rosengarth et Luecke, 2003). Une troisième proposition provient de l'association des annexines avec les protéines S100 (voir § 2.2.3). Les complexes tétramériques AnxA1-S100A1 et AnxA2-S100A10 présentent en effet deux sites de liaison aux membranes qui permettent d'établir des pontages entre deux membranes différentes, facilitant ainsi leur rapprochement (pour revue : Gerke et Moss, 2002) (**Figure 37**).

Quoiqu'il en soit, l'agrégation des membranes des vésicules dépendante des annexines, observée dans les cellules chromaffines ou les neutrophiles, constitue un prérequis à l'étape de fusion membranaire. Il apparaît que les annexines ne sont pas des protéines fusogéniques en soi, mais qu'elles favorisent uniquement le rapprochement des membranes (Creutz *et al.*, 1978, pour revue : Creutz, 1992).

c. Liaison aux phospholipides indépendante du calcium

Il s'avérerait que les annexines soient également capables de lier les phospholipides membranaires de manière indépendante du calcium. Malgré la modification de tous ses sites de liaison aux ions Ca^{2+} , l'AnxA2 reste capable de lier des vésicules lipidiques riches en PS (Filipenko *et al.*, 2000).

Cette propriété varie d'une annexine à l'autre, mais dans certains cas, il apparaîtrait que le paramètre majeur dans la régulation de ces liaisons membranaires indépendantes du calcium soit le pH. À titre d'exemple, l'AnxA5 s'associe aux PS membranaires en absence de calcium à pH 4 alors que celui-ci est nécessaire à pH 7 (Kohler *et al.*, 1997). Cependant, des associations indépendantes du calcium ont également été observées à pH 7 entre l'AnxA5 et la membrane plasmique des plaquettes (Jost *et al.*, 1997, pour revue : Tzima et Walker, 2000). Des travaux menés sur les annexines A2 et A5 proposent que ces interactions atypiques sont rendues possibles à la suite de changements de conformation induits d'une manière dépendante du pH (Jost *et al.* 1997, Beerman *et al.*, 1998, Filipenko *et al.* 2000).

Ces types de liaisons ne sont pas encore bien compris à l'heure actuelle. De plus, certaines études suggèrent que ces associations sont en fait modulées par la liaison de l'annexine à un ligand protéique, lequel étant lui-même transmembranaire ou associé à la membrane (Harder *et al.*, 1997, pour revue : Gerke et Moss, 2002).

2.2.2. La liaison aux protéines du cytosquelette

Plusieurs annexines sont également capables de se lier à certaines protéines du cytosquelette et plus particulièrement avec l'actine sous sa forme filamenteuse (actine-F) (pour revue : Hayes *et al.*, 2004). Des interactions directes entre l'Anx2 et l'actine-F ont été rapportées, lesquelles engagent l'extrémité C-terminale de l'AnxA2 (Filipenko et Waisman, 2001) et sous-entendent l'implication de cette dernière dans la régulation de la dynamique des membranes. Concernant l'AnxA5, celle-ci est relocalisée sous la membrane plasmique suite à l'activation plaquettaire, où elle se lie de manière calcium-dépendante au cytosquelette d'actine (actine-F). Des travaux complémentaires ont rapporté sa liaison préférentielle avec une isoforme bien spécifique de l'actine, l'actine- γ (Tzima *et al.*, 1999, Tzima *et al.*, 2000).

2.2.3. La liaison aux protéines S100

De nombreux ligands cytosoliques peuvent lier la région N-terminale des annexines. À ce propos, des interactions entre certaines annexines et des représentants de la famille des protéines S100 ont pu être rapportées.

Les protéines S100 sont de petites protéines d'environ 10 kDa, qui ont la particularité de lier les ions Ca^{2+} grâce à deux motifs « Main-EF ». Presque toutes les protéines de cette famille existent sous la forme d'un homodimère dans lequel deux molécules S100 sont assemblées de manière antiparallèle par des liaisons non covalentes. La présence de mutations dans ses domaines « Main-EF » fait de la protéine S100A10 la seule représentante de cette famille à avoir perdu sa capacité de liaison aux ions Ca^{2+} (pour revue : Donato, 2001).

Des liaisons entre l'AnxA1 et la protéine S100A11 (Mailliard *et al.*, 1996), l'AnxA2 et la protéine S100A10 (p11) (Rety *et al.*, 1999), l'AnxA6 et la protéine S100A6 (Tokumitsu *et al.*, 1992) et entre l'AnxA6 et le complexe S100A8/A9 (calgranuline A/B) (Bode *et al.*, 2008) ont été démontrées.

Ces interactions requièrent la formation d'une hélice α amphipathique par les résidus 1 à 14 de la région N-terminale des annexines (**Figure 36**).

Le complexe tétramérique AnxA2-S100A10, constitué de deux molécules AnxA2 associées symétriquement à deux molécules S100A10, reste le mieux caractérisé. Il a été largement étudié en raison de son rôle potentiel dans les processus d'agrégation des vésicules lipidiques et d'exocytose. En effet, de manière similaire au complexe AnxA1-S100A11, la structure en tétramère du complexe AnxA2-S100A10 permet à l'AnxA2 de jouer un rôle dans le pontage entre deux membranes [Lambert *et al.*, 1997, Sopkova-de Oliveira Santos *et al.*, 2000, Menke *et al.*, 2004, voir § 2.2.1 (**Figure 37**)].

2.2.4. Formation de canaux calciques

Plusieurs études démontrent qu'une fois insérées dans des bicouches lipidiques artificielles, certaines annexines, et notamment l'AnxA5, présentent plusieurs propriétés similaires aux canaux ioniques. Une sélectivité pour les ions Ca^{2+} , une dépendance au voltage ainsi qu'une conductance équivalente à celles des canaux calciques ont pu être rapportées (Rojas *et al.*, 1990, Berendes *et al.*, 1993).

Les premiers modèles proposés par Pollard et Rojas pour expliquer l'insertion de l'AnxA7 dans les membranes reposaient sur un profond réarrangement structural de la protéine (Pollard et Rojas, 1988, Pollard *et al.*, 1991). Cependant, ils se sont avérés peu compatibles avec les données de microscopie électronique qui furent publiées par la suite. Une autre explication impliquant une réorientation des phospholipides se montre alors plus plausible. Ce concept avait d'ailleurs été avancé par Huber et associés lorsqu'ils montraient qu'une pénétration profonde de l'AnxA5 dans la bicouche lipidique n'était possible que lorsqu'elle était accompagnée d'une restructuration localisée de la membrane (Huber *et al.*, 1990). Toutefois, l'idée selon laquelle le pore central, révélé lors des études structurales cristallographiques, constitue la voie d'entrée des ions Ca^{2+} reste controversée. Il en est de même sur la potentielle responsabilité de ses résidus centraux dans la sélectivité ionique (Huber *et al.*, 1990, Huber *et al.*, 1992b, pour revue : Huber *et al.*, 1992a). Il apparaît en effet que le diamètre du pore n'est pas en accord avec les données de conductance obtenues.

Plus tard, Kirsch *et al.*, rapportent que les annexines A2, A5 et A6 sont capables de s'insérer dans la bicouche lipidique des vésicules matricielles libérées par les chondrocytes hypertrophiques. La formation de ces canaux calciques permettrait l'influx d'ions Ca^{2+} à l'intérieur de ces particules, étape nécessaire à l'initiation de la minéralisation (Kirsch *et al.*, 1997b, voir § 4.3.1). La présence de bicouches riches en PS induirait la formation d'hexamères d'AnxA5 capables de s'insérer, de manière calcium-dépendante, dans les membranes et d'induire un influx d'ions Ca^{2+} dans les vésicules matricielles (Kirsch *et al.*, 1997b). L'importance de la composition de la bicouche lipidique, du pH et de la concentration intracellulaire en calcium a également été soulignée dans la formation de ces canaux calciques (Kirsch *et al.*, 1997a, Wu *et al.*, 1997, Isas *et al.*, 2000). Cependant les mécanismes d'insertion ne sont, à ce jour, pas clairement expliqués.

2.2.5. Autres partenaires et propriétés connus de l'AnxA5

En plus de leur association aux ions Ca^{2+} , aux phospholipides anioniques, aux protéines S100 et au cytosquelette d'actine, d'autres partenaires des annexines ont été décrits. Des interactions avec des phospholipases, des kinases, des GTPases ainsi que leurs protéines activatrices (GAPs, *GTPase-activating proteins*), certains sucres ou encore des acides nucléiques sont rapportées (pour revues : Gerke et Moss, 1997, Gerke et Moss, 2002).

À propos de l'AnxA5, des liaisons avec certains types de collagène, les phospholipases A_2 et C (PLC), l'isoforme δ des PKC nouvelles (nPKC), l'échangeur sodium-calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), la calvéoline-3 ou encore avec la protéine CFTR ont pu être démontrées.

a. les phospholipases : PLA_2 et PLC

Les phospholipases constituent d'importants éléments de la signalisation cellulaire. La PLA_2 hydrolyse les phospholipides membranaires, permettant la libération d'acides gras tels que l'acide arachidonique. Ce dernier est par la suite métabolisé en eicosanoïdes, molécules médiatrices de l'inflammation.

Les annexines possèdent un fort pouvoir inhibant sur la PLA_2 . Toutefois, le mécanisme d'action semble bien moins évident qu'il n'y paraissait au départ. Certains travaux montrent que cette inhibition passerait par une interaction directe entre les deux protéines. Cela est connu pour l'AnxA1, qui régulerait négativement la cPLA_2 en s'y fixant *via* son extrémité C-terminale (Kim *et al.*, 2001). Cependant, la majorité des auteurs propose que les annexines, notamment l'AnxA5, et la PLA_2 entrent en compétition pour la liaison aux phospholipides anioniques, entraînant ainsi une déplétion du substrat préférentiel de l'enzyme et donc son inhibition (Mira *et al.*, 1997). C'est ce même procédé qui est décrit pour expliquer l'effet inhibiteur, *in vitro*, de l'AnxA5 sur l'activité enzymatique de la PLC (Utsumi, 1992). Ce modèle d'inhibition par séquestration du substrat rejoint celui proposé par Dubois et collaborateurs dans le cadre de l'inhibition des cPKC par l'AnxA5 (Dubois *et al.*, 1998).

b. la PKC δ

Connaissant le pouvoir inhibant de l'AnxA5 sur les cPKC, une étude rapporte, de façon étonnante, que l'interaction entre l'AnxA5 et l'isoforme δ des nPKC est une étape essentielle à sa translocation dans la fraction particulaire. Cette liaison transitoire engage les résidus 157 à 164 de l'AnxA5 et a été démontrée *in vitro* et *in vivo*. Elle surviendrait à la suite de l'activation de la nPKC δ et serait donc primordiale pour sa future translocation et sa fonction (Kheifets *et al.*, 2006).

c. l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et la calvéoline-3

Dans les cardiomyocytes humains, l'AnxA5, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, qui assure l'efflux d'ions Ca^{2+} et favorise la relaxation, et la calvéoline-3 forment un complexe membranaire dont la quantité est augmentée au cours de l'insuffisance cardiaque (IC). L'association entre l'AnxA5 et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est dépendante du calcium et impliquerait la boucle de régulation cytoplasmique de l'échangeur (Camors *et al.*, 2005, Camors *et al.*, 2006). La mise en évidence de ce complexe trimoléculaire engagerait l'Anx5 dans l'IC (voir § 4.2).

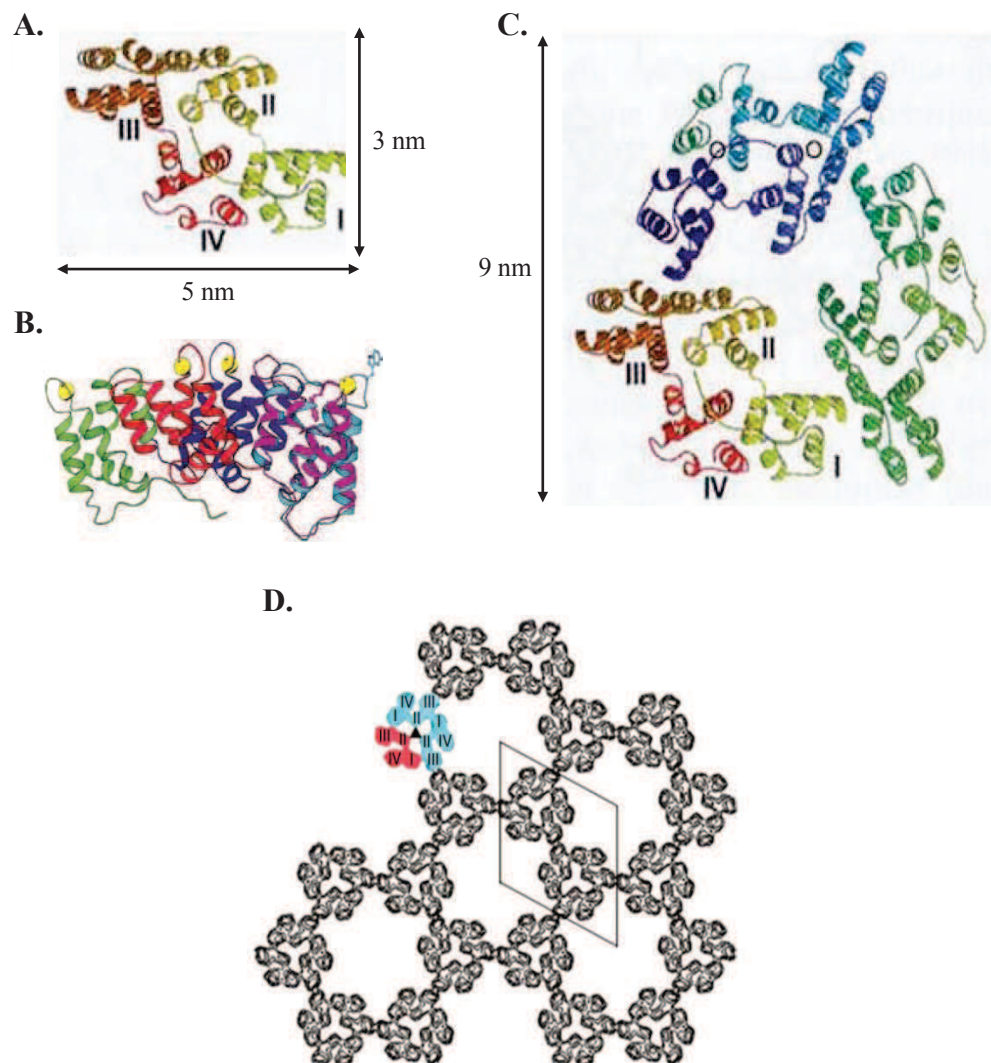


Figure 38 (A-D) : Différentes organisations de l'annexine A5

A. Vue de dessus d'un monomère : les quatre domaines homologues, numérotés de I à IV, sont apparents. **B.** Vue de côté d'un monomère : les domaines montrent une organisation spatiale plane et légèrement incurvée (cf. **Figure 37**). **C.** Organisation trimérique de l'AnxA5. **D.** Arrangement en une structure cristalline de trimères liés à une membrane lipidique chargée négativement. Un trimère d'AnxA5 apparaît coloré, avec un monomère en rouge et deux monomères en bleu.

AnxA5 : annexine A5

adaptée de Sopkova et al., 1993 et de Bouter et al., 2011

d. la protéine CFTR

Au sein de notre laboratoire, dans le cadre de la recherche de nouveaux partenaires de la protéine CFTR, une interaction directe entre l'AnxA5 et le canal ionique a été mise en évidence. Cette liaison est dépendante du calcium, engage le domaine NBD1 du CFTR et n'est pas altérée par la perte du résidu F508. Par ailleurs, ces travaux montrent que les courants médiés par le CFTR dépendent du niveau d'expression intracellulaire de l'AnxA5 (Trouvé *et al.*, 2007, Le Drévo *et al.*, 2008). Une interaction entre le complexe AnxA2-S100A10 et le CFTR a également été décrite (Borthwick *et al.*, 2007). Cette association, AMPc/PKA/ calcineurine(CaN)-dépendante, se révèle importante pour la régulation de l'activité du canal CFTR dans les épithélia.

e. le collagène

Une propriété qui n'a, jusqu'alors, été décrite que pour l'AnxA5 est sa liaison avec le collagène, composant de la matrice extracellulaire du tissu cartilagineux. Cette interaction a été rapportée lors de la recherche d'un récepteur au collagène dans les chondrocytes, pendant laquelle Mollenhauer et collaborateurs ont isolé par chromatographie d'affinité une protéine appelée anchorine CII (Mollenhauer et von der Mark, 1983, Mollenhauer *et al.*, 1984, Kirsch et Pfaeffle, 1992). Cette protéine, depuis renommée AnxA5, est capable de se lier avec une forte affinité aux collagènes de type II et X par son domaine C-terminal. Une liaison de plus faible affinité avec le collagène de type I a aussi été observée (Turnay *et al.*, 1995).

Cette association permet à l'AnxA5 de jouer un rôle majeur dans la minéralisation physiologique du cartilage de croissance (pour revue : von der Mark et Mollenhauer, 1997, voir § 4.3.1).

f. propriété d'auto-assemblage de l'AnxA5

Une particularité intéressante de l'AnxA5, également observée pour d'autres membres de cette famille, est sa capacité d'auto-association une fois liée aux PS membranaires (Andree *et al.*, 1992, Pigault *et al.*, 1994, Voges *et al.*, 1994, pour revue : Gerke *et al.*, 2005). La liaison entre annexines et membranes modèles a été étudiée par un grand nombre d'approches biochimiques et biophysiques. Un modèle reliant adsorption et organisation 2D de l'AnxA5 à la surface d'une bicouche lipidique supportée négativement chargée a été élaboré par l'équipe d'A.R. Brisson. Selon ce modèle, les annexines en solution sont bien individualisées (monomères) mais peuvent, une fois fixées à la membrane, former des auto-assemblages supramoléculaires de trimères grâce à des interactions latérales (**Figure 38**). Ces organisations seraient observées en présence d'une concentration en ions Ca^{2+} de l'ordre du millimolaire (mM). En outre, l'augmentation de la quantité d'AnxA5 fixée conduit à une association de ces trimères et à la formation de cristaux 2D (Reviakine *et al.*, 1998, Richter *et al.*, 2005).

Cette propriété explique pourquoi plusieurs auteurs ont engagé certaines de ces protéines dans la régulation de l'organisation et de la dynamique des membranes (Oling *et al.*, 2001, pour revue : Gerke *et al.*, 2005).

2.3. Synthèse des caractéristiques structurales et des principales propriétés de l'AnxA5 (voir Tableau V)

Tableau V : Synthèse des caractéristiques structurales et des principales propriétés de l'AnxA5

annexine A5 ◦ protéine d'environ 35 kDa (320 aa) ◦ connue sous différents noms : lipocortine V, endonexine II, PAP I, calphobindine I, anchorine CII ◦ chez l'Homme, codée par un gène de 29 kb, localisé sur le bras long du chromosome 4 (4q27)	Principales propriétés décrites	Références
1- caractéristiques structurales • domaine C-terminal : « cœur » de l'annexine → quatre régions homologues répétées I à IV (~ 70 aa) → chaque région structurée en cinq hélices α (A-E) → quatre sites de liaison aux ions Ca^{2+} (1 site/répétition) → présente la forme d'un pavé légèrement incurvé <u>face convexe</u> : liaison aux ions Ca^{2+}, interaction avec bicouche lipidique (PS, PA, PI) <u>face concave</u> : interaction avec partenaires cytosoliques • domaine N-terminal : → très court, limité à quelques résidus → absence de site de phosphorylation par cPKC 2- distribution cellulaire et tissulaire ◦ protéine majoritairement intracellulaire (libre dans le cytoplasme ou associée aux membranes) → expression abondante et ubiquitaire (isolée initialement dans le placenta) ◦ identifiée dans compartiment extracellulaire (malgré l'absence de peptide signal) → mécanisme d'externalisation non élucidé	◦ liaison (forte affinité) aux phospholipides anioniques membranaires (PS, PA, PI), de manière Ca^{2+}-dépendante → association réversible	Raynal et Pollard, 1994 Gerke <i>et al.</i>, 2005
	1- partenaires identifiés ◦ protéines du cytosquelette : actine-F (plaquettes : isoforme-γ) → association Ca^{2+}-dépendante ◦ récepteur à VEGF (VEGFR-2) et intégrines (sous-unité β_5) (portion intracellulaire) ◦ nPKC : isoforme δ ◦ formation d'un complexe trimoléculaire membranaire avec l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et la calvéoline-3 → association Ca^{2+}-dépendante ◦ collagènes de type II et X (composants de la matrice extracellulaire du tissu cartilagineux) ◦ domaine NBD1 de la protéine CFTR (wt et F508del) → association Ca^{2+}-dépendante	Tzima <i>et al.</i>, 1999 Tzima <i>et al.</i>, 2000 Wen <i>et al.</i>, 1999 Andersen <i>et al.</i>, 2002 Kheifets <i>et al.</i>, 2006 Camors <i>et al.</i>, 2006 Mollenhauer et von der Mark, 1983 Mollenhauer <i>et al.</i>, 1984 Kirsch et Pfaeffle, 1992 Trouvé <i>et al.</i>, 2007 Le Drévo <i>et al.</i>, 2008
	2- pouvoir inhibiteur ◦ inhibition de l'activité des PLA_2, PLC et cPKC → séquestration du substrat phospholipidique (phospholipases et AnxA5 en compétition pour les PS membranaires)	Utsumi, 1992 Mira <i>et al.</i>, 1997 Dubois <i>et al.</i>, 1998
	3- autres propriétés ◦ capacité à former des canaux calciques une fois insérée : → dans bicouches lipidiques artificielles → dans membranes des VM et des chondrocytes hypertrophiques : (mécanisme d'insertion non résolu, mais dépendant du pH, de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et de la composition de la bicouche) ◦ monomères d'AnxA5 : capacité d'auto-assemblage en trimères (une fois liés aux PS), qui s'associent pour former des structures cristallines (réseaux 2D d'AnxA5) → propriété observée en présence d'une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de l'ordre du mM	Huber <i>et al.</i>, 1990, Huber <i>et al.</i>, 1992a,b Rojas <i>et al.</i>, 1990, Berendes <i>et al.</i>, 1993 Kirsch <i>et al.</i>, 1997a,b Wu <i>et al.</i>, 1997 Isas <i>et al.</i>, 2000 Andree <i>et al.</i>, 1992, Concha <i>et al.</i>, 1992 Pigault <i>et al.</i>, 1994, Voges <i>et al.</i>, 1994 Reviakine <i>et al.</i>, 1998, Oling <i>et al.</i>, 2001 Richter <i>et al.</i>, 2005

AnxA5 : annexine A5, aa : acide aminé, $[\text{Ca}^{2+}]_i$: concentration intracellulaire en calcium, Ca^{2+} : ion calcium, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
kb : kilobase, kDa : kilodalton, mM : millimolaire, Na^+ : ion sodium, NBD1 : domaine 1 de liaison aux nucléotides (NBD, *nucleotide binding domain*), PAP I : placental anticoagulant protein I
(c/n)PKC : protéine kinase C (conventionnelle/nouvelle), PA : acide phosphatidique, PI : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylsérine, PLA_2 , PLC : phospholipase A2, phospholipase C
réseaux 2D : réseaux bidimensionnels, VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor), VM : vésicules matricielles, wt : *wild-type*

3. Distribution cellulaire et tissulaire des annexines

Les annexines présentent de multiples distributions intracellulaires et oscillent souvent entre une forme librement distribuée dans le cytoplasme et une forme associée aux membranes lorsque les niveaux en ions Ca^{2+} s'élèvent. Suite à l'expression de chimères GFP, elles ont souvent été retrouvées associées à la membrane plasmique et aux membranes des sentiers de la biosynthèse et de l'endocytose (pour revues : Gerke et Moss, 1997, Gerke et Moss, 2002).

Quelques annexines sont également présentes dans le noyau. C'est le cas de l'AnxA5 et des annexines A1, A2 et A11. Chez le rat, une translocation de l'AnxA5 au niveau de la membrane nucléaire et dans le noyau de cellules gonadotropes activées a été observée suite à une ovariectomie (Kawaminami *et al.*, 1998). Selon les auteurs, cette migration pourrait être médiée par l'association de l'AnxA5 à deux protéines nucléaires (hélicase XH2 et ADN méthyltransférase) (Ohsawa *et al.*, 1996). Dans les cellules endothéliales (HUVECs, *human umbilical vein endothelial cells*), cette annexine est relocalisée dans le noyau sous l'effet d'un stress oxydatif (Sacre et Moss, 2002). Plus récemment, Klement et collaborateurs proposent, à partir de cultures primaires de fibroblastes humains, que l'accumulation d'AnxA5 au niveau de la membrane nucléaire serait un biomarqueur du vieillissement cellulaire (Klement *et al.*, 2012).

Les annexines sont principalement des protéines intracellulaires. Cependant, malgré le fait qu'elles ne possèdent pas de signal d'exportation extracellulaire, plusieurs d'entre elles ont été identifiées dans des compartiments extracellulaires, où certaines fonctions leur ont été attribuées. À ce jour, quelques voies alternatives non conventionnelles ont été décrites pour les annexines A1 et A2. Les mécanismes responsables de la sécrétion des annexines A4 et A5 restent, quant à eux, en grande partie non élucidés.

La liaison calcium-dépendante de l'AnxA5 avec les corps lamellaires pourrait expliquer leur sécrétion simultanée par les cellules alvéolaires de type II (Sohma *et al.*, 2001). Il a également été montré que l'AnxA5, située dans le sarcolemme des cardiomyocytes, était en partie relocalisée dans l'espace interstitiel au cours de l'IC (Benevolensky *et al.*, 2000). Enfin, elle serait aussi libérée par les cardiomyocytes de rat et les macrophages THP-1 lors de l'apoptose (Monceau *et al.*, 2004, Ravassa *et al.*, 2005).

Chez des individus sains, l'AnxA5 est présente dans le plasma à une concentration de 1,9 ($\pm$ 0.7) ng/ml (Matsuda *et al.*, 2003). En fonction de l'étude considérée et des techniques utilisées, des variations peuvent néanmoins être observées (Kaneko *et al.*, 1996, van Tits *et al.*, 2007). Des travaux menés récemment dans notre laboratoire et mettant en œuvre la technique de SPR rapportent un niveau d'AnxA5 circulante de l'ordre de 5 ng/ml (Trouvé *et al.*, 2012). Par ailleurs, une corrélation entre la quantité d'AnxA5 circulante et diverses pathologies, telles que l'infarctus aigu du myocarde, la cardiopathie valvulaire, la thrombose mais aussi certains cancers, a également été démontrée (Kaneko *et al.*, 1996, Matsuda *et al.*, 2003, Rand *et al.*, 2006, van Tits *et al.*, 2007).

Le niveau d'expression et la distribution tissulaire des annexines sont extrêmement variés. L'AnxA5 est une protéine ubiquitaire, présente en grande quantité dans le placenta, ce qui explique qu'elle y ait été isolée initialement (Bohn et Kraus, 1979, Reutelingsperger *et al.*, 1985, Funakoshi *et al.*, 1987). Les annexines A1, A2, A4, A6, A7 et A11 montrent également une expression abondante et ubiquitaire. En revanche, certains représentants de cette famille sont exprimés de manière plus sélective : c'est le cas de l'AnxA3 retrouvée dans les neutrophiles, de l'AnxA10 dans l'estomac ou encore de l'AnxA13 dans l'intestin et le rein.

4. Les différentes fonctions des annexines

La séquence protéique et la structure tridimensionnelle du « cœur » des annexines montrent une grande conservation au cours de l'évolution. De plus, elles sont présentes en grande quantité dans les cellules eucaryotes et s'expriment dans quasiment tous les types cellulaires. Ces observations suggèrent leur importance physiologique, bien que les procaryotes semblent tolérer leur absence.

A l'heure actuelle, et malgré les nombreux travaux mis en oeuvre, les fonctions biologiques des annexines n'ont toujours pas été précisées. Toutefois, les multiples propriétés et partenariats rapportés les engagent dans de multiples processus. Les protéines de cette famille multi-génique sont impliquées dans de nombreux phénomènes liés aux membranes, tels le trafic et l'organisation des membranes cellulaires. Des fonctions de régulateurs de canaux ioniques leur sont également attribuées, ainsi que des activités extracellulaires avec des rôles dans l'inflammation et la coagulation sanguine (pour revues : Gerke et Moss, 2002, Rescher et Gerke, 2004, Gerke *et al.*, 2005).

4.1. Dans le trafic et l'organisation des membranes cellulaires

4.1.1. La mise en place de la polarité des cellules épithéliales

Une annexine particulièrement étudiée dans ce phénomène est l'AnxA13, qui n'est exprimée que dans certains types cellulaires polarisés. Dans la lignée MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), l'AnxA13b est spécifiquement localisée au niveau du TGN et de la membrane plasmique apicale. L'utilisation d'anticorps dirigés contre cette protéine altère spécifiquement le trafic des vésicules du TGN vers le pôle apical, sans affecter le transport basolatéral. Cette observation souligne ainsi le rôle très spécifique de l'AnxA13b dans le trafic vésiculaire (Fiedler *et al.*, 1995, Lecat *et al.*, 2000). Bien que des zones d'ombre persistent quant aux mécanismes impliqués, il apparaît que l'AnxA2 soit également un acteur central de la genèse de la polarité épithéliale (pour revue : Grieve *et al.*, 2012).

4.1.2. L'exocytose

Certaines annexines sont également engagées dans un second événement de trafic membranaire : l'exocytose (pour revue : Creutz, 1992). Les annexines ne sont pas des protéines fusogéniques (voir § 2.2.1) mais leur capacité à agréger des vésicules de sécrétion leur permettrait de promouvoir, avec d'autres protéines telles que les SNARE, la fusion membranaire au cours de l'exocytose régulée par le calcium. L'AnxA2 reste à ce jour le membre le plus impliqué dans ce

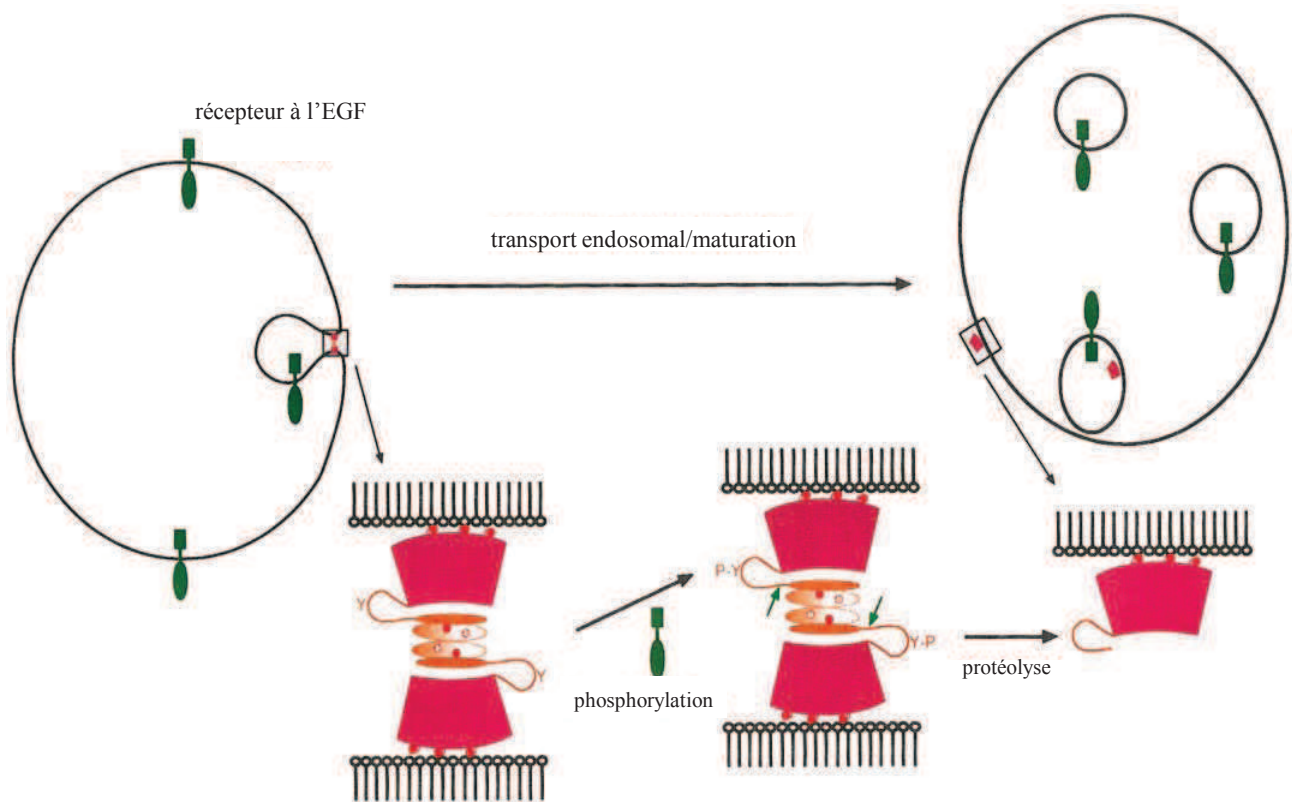


Figure 39 : Modèle décrivant le rôle du tétramère AnxA1-S100A11 dans la formation des vésicules internes des endosomes multi-vésiculaires

AnxA1 : annexine A1, EGF : *epidermal growth factor*, Y-P (P-Y) : résidu tyrosine phosphorylé

adaptée de la revue de Gerke et Moss, 2002

processus. De nombreuses études rapportent sa présence ainsi que celle du tétramère AnxA2-S100A10 au niveau de points de contact entre les vésicules de sécrétion et la membrane plasmique, et cela dans plusieurs types cellulaires. Son rôle dans ce processus a initialement été proposé en étudiant la sécrétion de catécholamines par les cellules chromaffines (Ali *et al.*, 1989).

4.1.3. L'endocytose

Les membranes du système endosomal ont également été identifiées comme structures cibles des annexines A1, A2 et A6. À titre d'exemple, le complexe AnxA1-S100A11 est engagé dans le rapprochement des membranes au cours du processus de bourgeonnement des vésicules internes des endosomes multi-vésiculaires (Futter *et al.*, 1993) (**Figure 39**). Selon le modèle proposé, l'AnxA1 (substrat de la kinase du récepteur à l'EGF) devient phosphorylée lors de la formation des endosomes tardifs multi-vésiculaires contenant le récepteur internalisé. Cette phosphorylation (tyrosine T20) modifie la sensibilité de l'AnxA1 pour le calcium et la protéolyse. Le clivage protéolytique entraîne : i) la rupture du complexe AnxA1-S100A11, ii) la libération du dimère S100A11, associé à l'extrémité N-terminale de l'AnxA1, iii) la fission des membranes et finalement iv) l'émission de vésicules internes (Futter *et al.*, 1993, pour revue : Gerke et Moss, 2002).

4.1.4. La phagocytose

Ce mode particulier d'endocytose n'est présent que dans certains types de cellules spécialisées. Plusieurs travaux rapportent l'engagement des annexines A1 et A2 dans le processus phagocytotique. Parmi les études récentes, Patel et collaborateurs montrent que l'AnxA1 serait un nouveau lien fonctionnel entre les filaments d'actine et le phagosome tout au long du processus de phagocytose (Patel *et al.*, 2011). L'incubation de cellules épithéliales pulmonaires avec l'interféron-gamma (IFN- γ) entraîne la translocation de l'AnxA2 à la surface des cellules où elle interviendrait dans la phagocytose des corps apoptotiques. Il est également précisé que la formation du tétramère AnxA2-S100A10 est requise pour cette translocation (Fang *et al.*, 2011).

Enfin, ces mêmes annexines semblent engagées dans la phagocytose d'une toute autre façon. En effet, elles seraient impliquées dans la clairance des corps apoptotiques dans le sens où elles pourraient être identifiées comme des signaux « *eat-me* » par les phagocytes. L'étude initiatrice datant de 2003, rapporte que les PS, présents à la surface des cellules apoptotiques, ne lieraient pas directement leurs récepteurs à la surface des phagocytes, mais plutôt de manière indirecte *via* l'AnxA1 (Arur *et al.*, 2003). Au cours de l'apoptose cette dernière serait transloquée du cytosol vers des domaines riches en PS au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. Depuis, quelques études ont pu confirmer ces observations (Fan *et al.*, 2004, Scannel *et al.*, 2007).

4.2. La régulation de canaux ioniques par les annexines

Bien que la capacité des annexines à former des canaux calciques reste sujet à débat, les données sur la régulation de la localisation et de l'activité de canaux ioniques sont moins controversées.

L'AnxA4 a été identifiée dans la modulation de l'activité de canaux chlorure calcium-dépendants. Dans des cellules épithéliales de côlon humain (lignée T84), son oligomérisation près de ces canaux empêche leur phosphorylation et leur activation par la protéine kinase CaMKII (Kaetzel *et al.*, 1994, Chan *et al.*, 1994). Le complexe AnxA2-S100A10 régulerait le transport de nombreux canaux ioniques à la membrane plasmique et leur activité. Parmi ceux-ci sont retrouvés plusieurs types de canaux sodiques (Na_v 1.8), potassiques (TASK-1, *two-pore acid-sensitive potassium channel 1*) ou encore calciques (TRPV5 et TRPV6, *transient receptor potential vanilloid 5 and 6*) (Nilius *et al.*, 1996, Girard *et al.*, 2002, Okuse *et al.*, 2002, van de Graaf *et al.*, 2003, Borthwick *et al.*, 2008a).

L'AnxA5, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et la calvéoline-3 forment, dans les cardiomyocytes, un complexe trimoléculaire dont la quantité est augmentée au cours de l'IC (voir § 2.2.5). Cette dernière se caractérise par une altération de la contraction du cardiomyocyte, qui est en partie liée à une modification de l'activité des protéines du cycle calcique et de leurs facteurs régulateurs. Il a été montré que la surexpression de l'AnxA5 entraînait une augmentation de l'amplitude de contraction, associée à une augmentation de l'amplitude du cycle calcique des cardiomyocytes (Camors *et al.*, 2006). Ces travaux suggèrent que l'AnxA5 serait un facteur régulateur du cycle calcique en augmentant l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ainsi, le renforcement du complexe trimoléculaire observé au cours de l'IC pourrait participer à la perturbation de l'homéostasie calcique (Camors *et al.*, 2006).

Enfin, plusieurs études établissent un lien physique et fonctionnel entre certaines annexines et le canal CFTR. Un résumé de ces dernières fera l'objet d'un prochain paragraphe [voir § 5. (Tableau VII)].

4.3. Autres rôles fonctionnels décrits pour l'AnxA5

4.3.1. Implication dans la minéralisation du cartilage de croissance

Plusieurs études rapportent la présence des annexines A2, A5 et A6 dans la membrane des vésicules matricielles compétentes pour la minéralisation (Genge *et al.*, 1990, Kirsch *et al.*, 1997b). Elles y forment des canaux calciques permettant l'influx d'ions Ca^{2+} , nécessaire à l'initiation du processus de minéralisation (Kirsch *et al.*, 1997b). L'utilisation de la molécule K-201, bloqueur des canaux calciques et ligand de l'AnxA5, inhibe l'influx d'ions Ca^{2+} et la formation de la première phase minérale dans la lumière des vésicules (Kaneko *et al.*, 1997a,b, Kirsch *et al.*, 2000a). Ces observations permettent d'impliquer directement ces annexines dans la minéralisation physiologique du cartilage de croissance (pour revue : Kirsch, 2005).

L'AnxA5 est également capable de lier les collagènes de type II et X (Mollenhauer *et al.*, 1984, Kirsch et Pfaeffle, 1992). Ces deux types de collagènes sont présents dans la matrice extracellulaire des chondrocytes différenciés compétents pour la minéralisation (Kirsch et van der Mark, 1992). L'interaction entre l'AnxA5 et les collagènes de type II et X a deux conséquences : i) l'ancrage des vésicules matricielles à la matrice extracellulaire et ii) la stimulation de l'activité canal calcique de l'AnxA5, entraînant une augmentation de l'influx calcique dans les vésicules et l'initiation du processus de minéralisation. Une réduction drastique de l'influx calcique dans les vésicules est observée à la suite du retrait sélectif des collagènes de type II et X (Kirsch et Wuthier, 1994, Kirsch *et al.*, 2000a). Ces résultats indiquent que l'AnxA5 joue un rôle majeur dans la minéralisation du cartilage et que son activité canal calcique est régulée par le collagène (Kirsch *et al.*, 2000a, pour revues : von der Mark et Mollenhauer, 1997, Kirsch, 2005, Kim et Kirsch, 2008).

Plus tard, ces mêmes auteurs rapportent que les annexines A2, A5 et A6 sont fortement exprimées dans les chondrocytes hypertrophiques, où elles sont également capables de former des canaux calciques dans la bicouche lipidique. L'influx d'ions Ca^{2+} , médié par les annexines, régule un large éventail d'événements liés à la différenciation terminale des chondrocytes tels que : i) l'expression de marqueurs de différenciation cellulaire et de minéralisation (facteur de transcription Cbfa1, phosphatase alcaline, ostéoclastine), ii) l'émission de vésicules matricielles, iii) la minéralisation de la matrice cartilagineuse et iv) l'apoptose (Wang et Kirsch, 2002, Wang *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2005). L'interaction entre l'AnxA5, présente à la surface des chondrocytes, et le collagène de type II pourrait se voir affecter cette maturation, par stimulation de l'activité canal calcique de l'AnxA5 (pour revue : Kirsch, 2005).

Enfin, alors que l'AnxA5 s'avère jouer un rôle crucial dans la minéralisation physiologique du cartilage de croissance, elle semble également impliquée dans la minéralisation pathologique du cartilage articulaire.

À la différence des chondrocytes du cartilage de croissance, qui possèdent une durée de vie limitée et se différencient, les chondrocytes du cartilage articulaire gardent un phénotype stable tout au long de leur vie. Dans le cartilage arthrosique, les chondrocytes montrent une expression accrue des annexines A2, A5 et A6 alors qu'elles ne sont pas présentes dans un cartilage articulaire normal (Mollenhauer *et al.*, 1999, Kirsch *et al.*, 2000b). De plus, des événements et des marqueurs de différenciation similaires à ceux relevés dans le cartilage de croissance sont observés dans le cartilage arthrosique. Alors que cette différenciation est cruciale pour la croissance osseuse par ossification endochondrale, elle conduit à la destruction du cartilage articulaire (Kirsch *et al.*, 2000b). Au vu du rôle central joué par les annexines dans la maturation des chondrocytes du cartilage de croissance, il apparaît logique qu'elles soient incriminées dans la stimulation de la différenciation des chondrocytes articulaires. Une étude menée par l'équipe de F. Lioté montre que l'AnxA5, fortement exprimée dans les lésions arthrosiques, est impliquée dans la destruction du cartilage au cours de l'arthrose, en stimulant notamment l'apoptose chondrocytaire. Les auteurs proposent que la répression de l'AnxA5 pourrait ralentir la progression de l'arthrose, en particulier en diminuant l'apoptose des chondrocytes articulaires (Ea *et al.*, 2008).

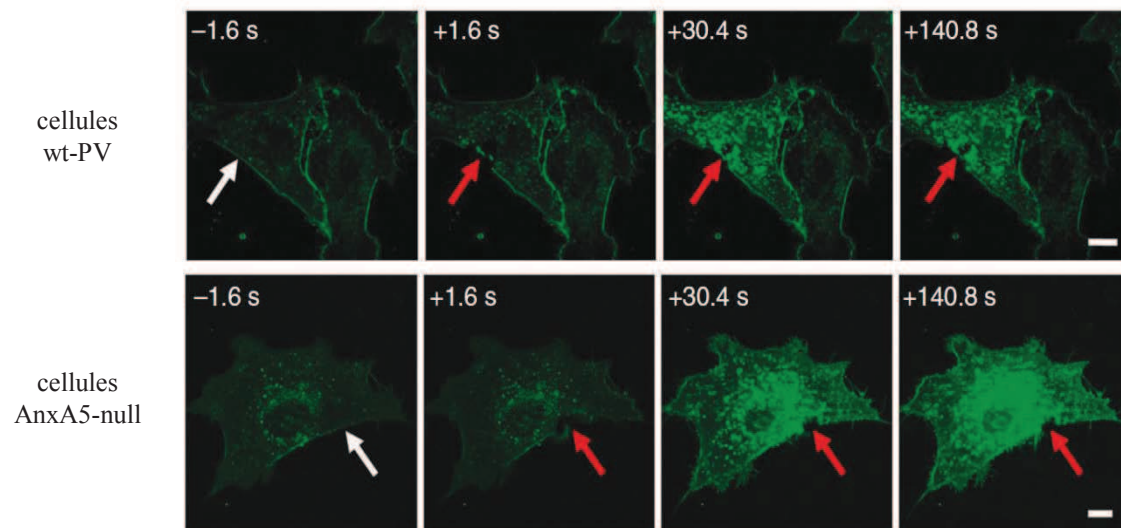


Figure 40 : Réponses des cellules wt-PV et AnxA5-null à une irradiation laser en présence de 2 mM de calcium

Cette séquence d'images permet de suivre le comportement des deux modèles cellulaires en réponse à une irradiation laser de 160 mW (la zone endommagée est indiquée par la flèche rouge). La membrane des cellules wt-PV est rapidement et spontanément réparée, alors que dans le cas des cellules AnxA5-null le processus de réparation n'est pas mis en place, comme en témoigne l'augmentation continue de l'intensité de fluorescence (lésion non colmatée).

AnxA5 : annexine A5, mM : millimolaire, PV : périvasculaire, s : seconde, wt : *wild-type* (sauvage)

d'après Bouter et al., 2011

4.3.2. Implication dans le processus de réparation des membranes cellulaires

L'équipe d'A.R. Brisson a récemment proposé un nouveau modèle de réparation des membranes cellulaires dans lequel l'AnxA5 et ses réseaux 2D semblent jouer un rôle central (Bouter *et al.*, 2011). Des ruptures membranaires ont été appliquées à des cellules périvasculaires (PV) témoins exprimant l'AnxA5 constitutivement (wt-PV) et à des cellules PV où le gène *anxA5* a été inactivé (AnxA5-null PV). L'utilisation de la molécule FM1-43, soluble dans l'eau et devenant fluorescente une fois intégrée dans la membrane mais incapable de la traverser, a permis de suivre le processus de réparation. Alors que les cellules wt-PV montrent une réponse rapide au niveau des points de rupture suite à l'irradiation, les cellules AnxA5-null présentent, quant à elles, un défaut de réparation de leur membrane plasmique (**Figure 40**). Ce défaut est contrecarré par l'ajout d'AnxA5 dans le milieu extracellulaire. L'influence du calcium, dont on connaît l'importance pour ce processus (Steinhardt *et al.*, 1994), a également été étudiée. En présence d'EGTA les cellules wt-PV montrent une augmentation continue de l'intensité de fluorescence, comparable à celle observée précédemment pour les cellules AnxA5-null. Ces cellules finissent finalement par mourir, réponse caractéristique de l'absence de réparation membranaire. L'utilisation de mutants de l'AnxA5 incapables de former des réseaux 2D a permis de préciser que la formation d'assemblages cristallins à la surface (interne) des membranes endommagées était essentielle pour le processus de réparation. D'après le modèle établi par Bouter et collaborateurs (**Figure 41**), ces réseaux formeraient un « bandage » au niveau de la zone de rupture, stoppant ainsi la progression de la déchirure et facilitant l'étape finale de colmatage (Bouter *et al.*, 2011).

Toutes les annexines se lient aux PS membranaires. Toutefois, certaines d'entre elles requièrent des besoins en ions Ca^{2+} plus faibles que l'AnxA5 (Skrahina *et al.* 2008). Cela soulève la question d'une éventuelle compétition et de la liaison simultanée de plusieurs annexines sur les PS. Ainsi, d'autres membres de la famille pourraient prendre part à ce processus. De plus, les réseaux 2D d'AnxA5 présentent une structure ouverte, il est alors tout à fait possible d'imaginer l'intégration de certaines annexines dans ces organisations cristallines. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par une étude conduite par le groupe de C. Schultz. En rapportant la formation d'ensembles hétérogènes entre les annexines A5, A1 et A2 à la membrane de cellules traitées avec de l'ionomycine, les auteurs proposent que de tels assemblages pourraient participer au processus de réparation membranaire (Skrahina *et al.* 2008).

4.4. Les fonctions extracellulaires des annexines

Bien qu'elles ne présentent pas de peptide signal permettant leur sécrétion, certaines annexines sont retrouvées dans le compartiment extracellulaire (surface des cellules et circulation) où elles sont engagées dans plusieurs processus biologiques.

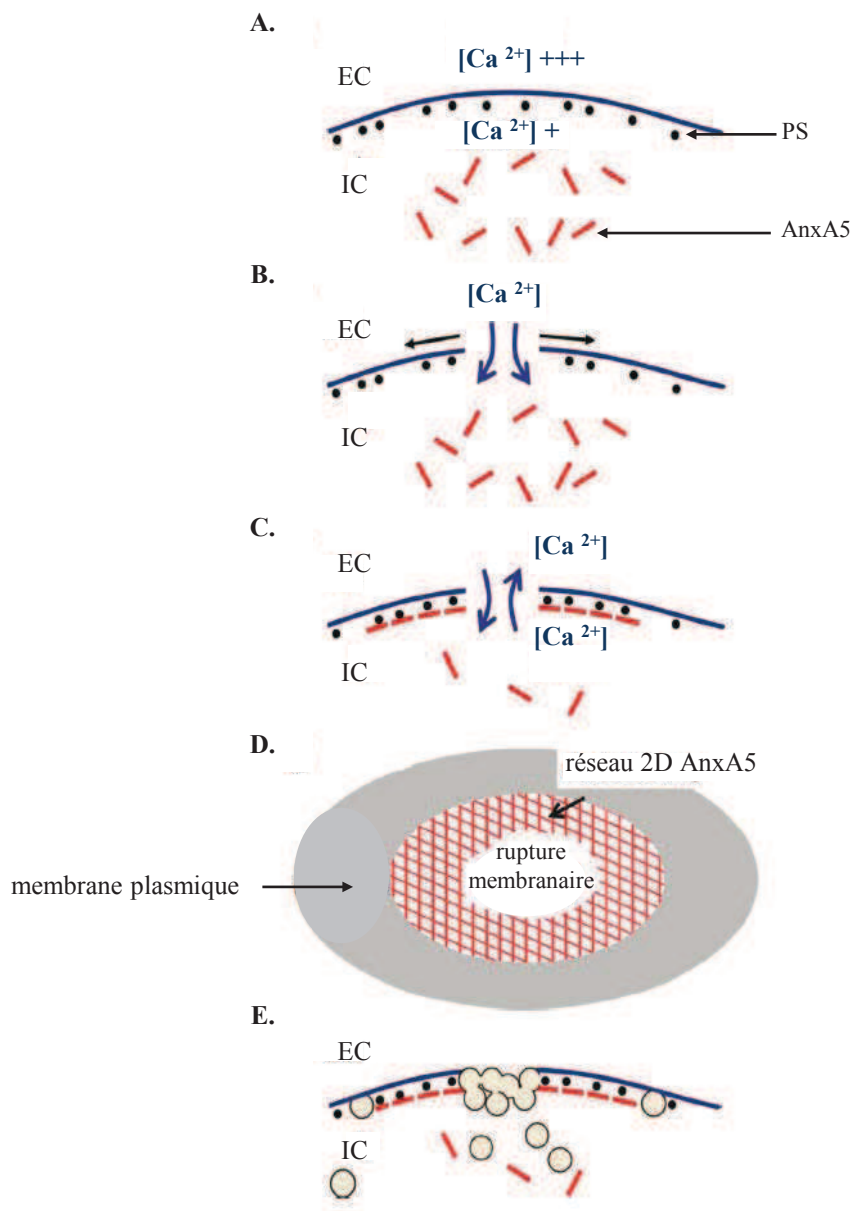


Figure 41 (A-E) : Modèle de réparation des membranes cellulaires proposé par Bouter *et al.*

A. Membrane cellulaire intacte. Les milieux extracellulaire (EC) et intracellulaire (IC) diffèrent par les concentrations en Ca^{2+} observées de part et d'autre de la membrane. Les monomères d'AnxA5 (traits rouges) et les PS (sphères noires) sont présents dans le milieu IC. **B.** Rupture locale de la membrane cellulaire. Les forces résultant de la tension membranaire tendent à élargir la déchirure (flèches noires). **C.** La formation d'un réseau 2D d'AnxA5 à la surface stoppe la progression de la déchirure. Il se forme au niveau de la zone de rupture un micro-environnement apportant les conditions optimales pour la formation de complexes entre les ions Ca^{2+} , les PS et l'AnxA5. Les molécules d'AnxA5 se lient aux PS exposées sur les bords du point de rupture et s'associent pour former des réseaux 2D de trimères. Cet assemblage 2D stabilise la membrane et stoppe l'expansion de la déchirure. **D.** Vue de dessus faisant apparaître la rupture membranaire et le réseau 2D d'AnxA5 environnant la déchirure. **E.** Étape finale de colmatage. Des vésicules cytoplasmiques sont recrutées au niveau de la zone de rupture et fusionnent, par exocytose, avec la membrane plasmique.

AnxA5 : annexine A5, Ca^{2+} : ion calcium, EC : extracellulaire, IC : intracellulaire, PS : phosphatidylsérine, 2D : bidimensionnel

adaptée de Bouter et al., 2011

4.4.1. Rôle dans l'inflammation

De nombreux travaux engagent l'AnxA1 dans le processus anti-inflammatoire. Certaines cellules immunitaires montrent une augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'AnxA1 à la suite d'une exposition aux glucocorticoïdes. Bien que cette fonction lui ait initialement été attribuée par sa capacité d'inhibition de la PLA₂, il est par la suite devenu plus évident que son activité anti-inflammatoire provienne de son interférence dans la migration de certains leucocytes vers le site de l'inflammation (Perretti *et al.*, 1993, pour revue : Perretti et Gavins, 2003).

Le rôle anti-inflammatoire des annexines A1 et A2 pourrait également s'expliquer par leur implication dans la clairance des corps apoptotiques. Dans certains cas, les annexines sont retrouvées exprimées à la surface des phagocytes, tels que les macrophages ou les cellules épithéliales pulmonaires, où elles régulent la phagocytose (Maderna *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2007, Fang *et al.*, 2011). Elles peuvent également être présentes à la surface des cellules apoptotiques et stimuler leur phagocytose en étant reconnues comme des signaux « *eat-me* » (Arur *et al.*, 2003, Fan *et al.*, 2004, Scannel *et al.*, 2007).

4.4.2. Rôle dans la coagulation sanguine

L'AnxA2 présente à la surface de l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans la fibrinolyse. En effet, sous sa forme tétramérique avec la protéine S100A10, elle est un corécepteur du plasminogène et de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), catalysant ainsi la formation de plasmine et la dégradation de la fibrine (pour revues : Hajjar et Krishnan, 1999, Kim et Hajjar, 2002).

L'AnxA5 serait quand à elle capable d'inhiber la coagulation, *in vivo*, par un mécanisme de compétition. En masquant les PS exposées par les plaquettes activées, l'AnxA5 empêche la fixation des facteurs de la coagulation (facteurs Va, Xa, prothrombine) et inhibe ainsi la formation du complexe prothrombinase (Reutelingsperger *et al.*, 1985, Funakoshi *et al.*, 1987, van Heerde *et al.*, 1994). L'AnxA5 pourrait également inhiber la génération de thrombine par la formation de structures 2D à la surface des plaquettes activées. Cette structure ne bloquerait pas entièrement la fixation des facteurs de la coagulation mais inhiberait la formation du complexe prothrombinase en empêchant les mouvements latéraux des facteurs liés aux PS (Andree *et al.*, 1992). Enfin, il a été proposé que le « bouclier anti-thrombotique » recouvrant la surface des cellules syncytiotrophoblastiques était composé d'un réseau 2D de molécules d'AnxA5 (Rand *et al.*, 2003, Rand et Wu, 2004). Ce bouclier protecteur déplacerait les facteurs de la coagulation des surfaces phospholipidiques et inhiberait la mise en place du processus thrombotique au niveau du placenta (Krikun *et al.*, 1994, Rand *et al.*, 2003).

4.4.3. Autres rôles de l'AnxA5 extracellulaire

a. un nouveau sentier de l'endocytose induit par l'AnxA5

Les cardiomyocytes sont capables, sous conditions de stress, d'internaliser l'AnxA5. Il en est de même pour les myoblastes et les neurones apoptotiques (van den Eijnde *et al.*, 2001, Mari *et al.*, 2004). Toutefois, ces deux études n'ont pas permis de révéler la voie d'endocytose mise en place.

environnement extracellulaire

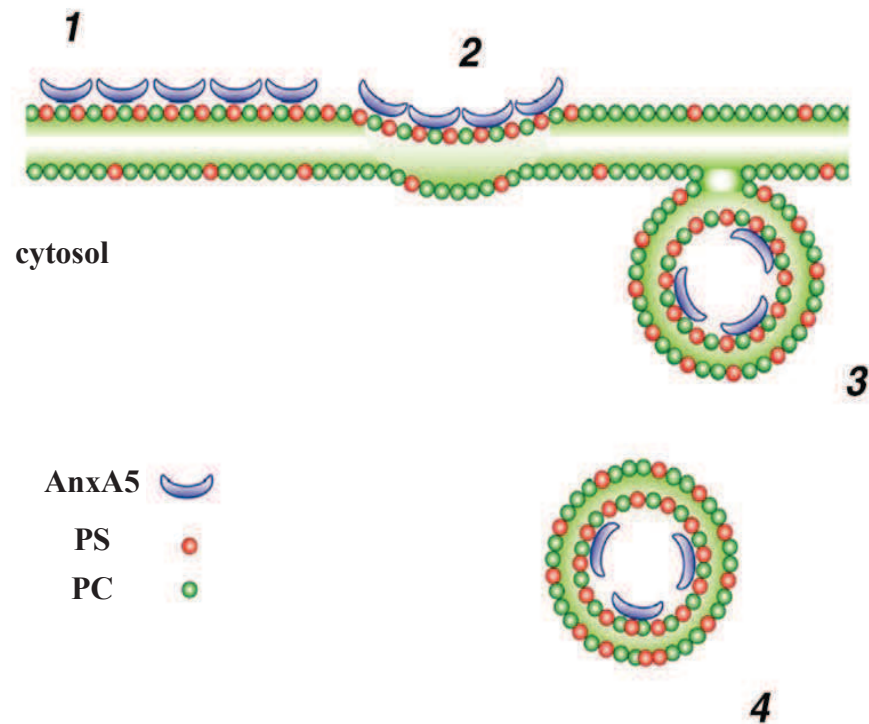


Figure 42 : Modèle proposé pour la nouvelle voie d'endocytose dépendante de l'annexine A5 et des phosphatidylsérines

La formation de réseaux 2D d'AnxA5 à la surface des cellules exposant des PS va entraîner l'invagination de patchs membranaires et l'internalisation de protéines situées à proximité des PS exposées. Ce processus d'endocytose se déroule suivant plusieurs étapes : **1)** liaison de l'AnxA5 extracellulaire aux PS exposées, **2)** formation d'une structure cristalline à la surface cellulaire induisant le fléchissement de la membrane plasmique, **3)** formation de la vésicule d'endocytose, et **4)** détachement de la vésicule et transport à travers le cytosol. Le mécanisme mis en jeu dans la fission des vésicules issues de la membrane plasmique n'a pas encore été déterminé.

AnxA5 : annexine A5, PS : phosphatidylsérine, PC : phosphatidylcholine, 2D : bidimensionnel

adaptée de la revue de van Gederen et al., 2008

Le processus de macropinocytose ou l'internalisation médiée par un récepteur sont généralement évoqués pour expliquer l'endocytose de protéines présentes dans l'environnement extracellulaire (pour revue : Conner et Schmid, 2003). Cependant, Kenis *et al.*, rapportent que l'internalisation de l'AnxA5 par les cellules Jurkat apoptotiques et les cellules HeLa viables est indépendante des voies d'endocytose précédemment décrites. La liaison de l'AnxA5 sur les PS externalisées semble avoir une place importante dans ce processus (Kenis *et al.*, 2004). Selon le modèle proposé (**Figure 42**), la formation de trimères d'AnxA5 et leur auto-association en une structure cristalline (réseaux 2D) à la surface cellulaire entraîneraient l'invagination de patches membranaires riches en PS et la formation de vésicules d'endocytose. Ces dernières seraient ensuite transportées dans le cytosol *via* les microtubules (Kenis *et al.*, 2004, pour revue : van Genderen *et al.*, 2008).

Il a été suggéré que cette voie d'endocytose permettrait l'internalisation de protéines situées à proximité des PS exposées. De cette façon, l'AnxA5 serait capable de réguler négativement l'expression de protéines présentes à la surface cellulaire (Ravassa *et al.*, 2005, pour revue : van Genderen *et al.*, 2008).

b. rôle à la surface des cellules apoptotiques

L'apoptose est caractérisée par de multiples changements biochimiques et cellulaires dans le noyau, le cytosol et à la surface cellulaire. Cela inclut l'activation des caspases, et notamment de la caspase 3, entraînant l'externalisation des PS et la génération de microparticules (Fadok *et al.*, 1992, Martin *et al.*, 1996).

L'AnxA5 extracellulaire serait capable d'inhiber la phagocytose des cellules apoptotiques (Krahling *et al.*, 1999, Callahan *et al.*, 2000). Cette inhibition s'expliquerait par la liaison spécifique (calcium-dépendante) de l'AnxA5 sur les PS exposées. Ce bouclier de protection empêcherait la reconnaissance de ces signaux « *eat-me* » par les phagocytes. Kenis *et al.*, confirment la mise en place de ce bouclier de protection mais ajoutent que l'inhibition de la phagocytose par l'AnxA5 s'explique également par l'internalisation de ligands situés à proximité des PS (Kenis *et al.*, 2006). Selon le modèle précédemment cité, la formation d'un réseau 2D d'AnxA5 au niveau des PS exposées par les cellules mourantes entraînerait l'internalisation de patches membranaires susceptibles d'arborer d'autres signaux « *eat-me* » reconnus par les phagocytes. Les auteurs soulignent que de fortes concentrations en AnxA5 extracellulaire sont requises pour l'inhibition de ce processus (Kenis *et al.*, 2006).

Enfin, la liaison de l'AnxA5 à la surface des cellules apoptotiques influencerait également la progression du programme de mort cellulaire. Des travaux montrent que l'AnxA5 retarde l'activation des caspases 3 suite à sa liaison à la surface de lymphocytes humains (Gidon-Jeangirard *et al.*, 1999). Toutefois, une autre étude rapporte que l'AnxA5 accélère le programme de mort cellulaire de cardiomyocytes de rat (Monceau *et al.*, 2004). Ces observations divergentes suggèrent que l'influence de l'AnxA5 sur l'apoptose dépendrait du type cellulaire mais également de l'élément déclencheur du programme de mort cellulaire (pour revue : van Genderen *et al.*, 2008).

c. applications biotechnologiques de l'AnxA5

Considérant sa propriété d'association calcium-dépendante avec les PS membranaires, l'AnxA5 est utilisée comme marqueur quasi universel de l'apoptose et comme élément de ciblage des plaquettes activées.

Dans des conditions normales, les PS sont retrouvées de manière prédominante dans le feuillet interne de la membrane (pour revue : Devaux, 1991). L'apoptose et l'activation plaquettaire se caractérisent par une modification de l'architecture de la bicouche lipidique et par une exposition d'une quantité significative de PS à la surface de la cellule (Bevers *et al.*, 1983, Fadok *et al.*, 1992). Ceci explique pourquoi l'AnxA5 et ses dérivés marqués, principalement fluorescents, sont utilisés en routine pour détecter ces deux phénomènes (Dachary-Prigent *et al.*, 1993, Koopman *et al.*, 1994, revue : Boersma *et al.*, 2005).

4.5. Synthèse des principales activités intracellulaires et extracellulaires décrites pour l'AnxA5 (voir Tableau VI)

5. Les annexines et la protéine CFTR : les origines du projet

Les premières études établissant un lien entre les annexines et la protéine CFTR remontent à une vingtaine d'années. En 1991, suite à des alignements de séquences (SWISS-PROT), Chap et collaborateurs mirent en évidence une homologie frappante entre ces deux protagonistes. Cette observation leur fit suggérer des interactions communes avec certains composés cellulaires (Chap *et al.*, 1991). Trois membres de cette famille multi-génique semblent particulièrement impliqués dans la relation annexine-CFTR : les annexines A1, A2 et A5. Leurs multiples propriétés et participations à divers processus cellulaires leur permettent d'intervenir à différents niveaux.

Une connexion fonctionnelle entre le CFTR et l'AnxA1 a été décrite. La perte de l'activité du canal ionique conduit à une réponse inflammatoire, laquelle serait liée à une dérégulation de la voie de l'AnxA1 (Bensalem *et al.*, 2005, Dalli *et al.*, 2010).

Le complexe AnxA2-S100A10, dont la formation est dépendante de la voie de signalisation AMPc/PKA/CaN, est capable de lier le canal CFTR présent à la membrane. L'AnxA2 ne serait pas directement liée au CFTR mais c'est la protéine S100A10 qui servirait de pont pour établir le lien physique entre le canal et l'annexine. De plus, cette association se révèle être importante pour la régulation de l'activité du canal chlorure CFTR dans les épithélia (Borthwick *et al.*, 2007). La formation du complexe macromoléculaire AnxA2-S100A10/CFTR n'a cependant pas été observée dans des cellules épithéliales bronchiques homozygotes pour la mutation F508del (lignée CFBE41o-). Les auteurs proposent que la voie de signalisation AMPc/PKA/CaN serait défectueuse dans ces cellules et que la présence de la protéine CFTR non mutée serait requise pour sa mise en place et la formation du complexe AnxA2-S100A10 (Borthwick *et al.*, 2008b, pour revue : Muimo *et al.*, 2009). Il est à noter que l'AnxA2 a également été identifiée comme récepteur pour *P. aeruginosa* à la surface de cellules épithéliales humaines (Kirschnek *et al.*, 2005).

Tableau VI : Synthèse des principales activités intracellulaires et extracellulaires décrites pour l'AnxA5 (1/2)

AnxA5 intracellulaire	Propriétés engagées	Principaux rôles fonctionnels décrits	Références
	◦ liaison avec actine-F (sous-membranaire)	→ rôle dans la régulation de la dynamique des membranes : connexion entre le cytosquelette d'actine sous-membranaire et la membrane plasmique	Tzima <i>et al.</i> , 2000
	◦ interaction avec nPKCδ	→ implication dans la signalisation de la nPKCδ : étape essentielle à sa translocation dans la fraction particulaire	Kheifets <i>et al.</i> , 2006
	◦ inhibition des PLA ₂ , PLC et cPKC :	→ implication dans la régulation de la prolifération cellulaire (cultures léiomyomes utérins humains et lignée HHUA)	Shibata <i>et al.</i> , 1997 Yamamoto <i>et al.</i> , 2001
	◦ liaison au récepteur à VEGF et aux intégrines (sous-unité β ₅)	→ implication dans la transduction du signal intracellulaire (HUVECs : régulation de la prolifération cellulaire médiée par VEGFR-2)	Wen <i>et al.</i> , 1999 Andersen <i>et al.</i> , 2002
	◦ formation de canaux calciques dans la membrane des VM ◦ interaction avec collagènes II et X	→ rôle majeur dans l'initiation de la minéralisation physiologique et dans la différenciation terminale des chondrocytes (cartilage de croissance) : influx calcique dans VM et chondrocytes hypertrophiques → implication dans la minéralisation pathologique du cartilage articulaire : stimulation de l'apoptose chondrocytaire	von der Mark et Mollenhauer, 1997 Kirsch <i>et al.</i> , 2000a Wang et Kirsch, 2002 Wang <i>et al.</i> , 2003, Wang <i>et al.</i> , 2005 Mollenhauer <i>et al.</i> , 1999 Kirsch <i>et al.</i> , 2000b Ea <i>et al.</i> , 2008
	◦ formation de réseaux 2D (liés aux PS membranaires)	→ rôle dans la régulation de l'organisation et de la dynamique des membranes → implication dans le processus de réparation des membranes cellulaires : stoppe la propagation de la déchirure induite par les forces de tension du cytosquelette	Oling <i>et al.</i> , 2001 Gerke <i>et al.</i> , 2005 Boutet <i>et al.</i> , 2011
	◦ association avec le canal CFTR (wt et F508del) ◦ liaison avec actine-F	⇒ régulation de canaux ioniques → élévation des courants médiés par le CFTR, en interférant avec l'internalisation du canal (amélioration de la stabilité des canaux CFTR dans la membrane plasmique)	Trouvé <i>et al.</i> , 2007 Le Drévo <i>et al.</i> , 2008 Faria <i>et al.</i> , 2010
	◦ complexe trimoléculaire membranaire avec l'échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺ et la calvéoline-3	→ rôle de facteur régulateur de l'homéostasie calcique : au cours de l'IC, surexpression de l'AnxA5 engagée dans l'augmentation de l'activité de l'échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺	Camors <i>et al.</i> , 2006

Tableau VI : Synthèse des principales activités intracellulaires et extracellulaires décrites pour l'AnxA5 (2/2)

AnxA5 extracellulaire	Propriétés engagées	Principaux rôles fonctionnels décrits	Références
	◦ liaison avec PS à la surface des plaquettes activées ◦ formation de réseaux 2D à la surface des plaquettes activées	→ activité anti-coagulante : inhibe la formation du complexe prothrombinase (compétition avec les facteurs de la coagulation pour les PS)	Reutelingsperger <i>et al.</i> , 1985 Funakoshi <i>et al.</i> , 1987 Andree <i>et al.</i> , 1992 van Heerde <i>et al.</i> , 1994
	◦ formation de réseaux 2D à la surface des cellules syncytiotrophoblastiques	→ activité anti-coagulante : « bouclier anti-thrombotique » (déplace les facteurs de la coagulation des surfaces phospholipidiques)	Rand <i>et al.</i> , 2003 Rand et Wu, 2004
	◦ formation de réseaux 2D au niveau de patches membranaires riches en PS	→ mise en place d'une nouvelle voie de l'endocytose : régule la présence de protéines à la surface cellulaire	Kenis <i>et al.</i> , 2004 Ravassa <i>et al.</i> , 2005
	◦ formation de réseaux 2D à la surface des cellules apoptotiques ◦ liaison avec PS à la surface des cellules apoptotiques	→ inhibition de la phagocytose des cellules apoptotiques : internalisation des signaux « eat-me » identifiés par les phagocytes → influence la progression du programme de mort cellulaire (retarde/accélère)	Krahling <i>et al.</i> , 1999 Callahan <i>et al.</i> , 2000 Kenis <i>et al.</i> , 2006 Gidon-Jeangirard <i>et al.</i> , 1999 Monceau <i>et al.</i> , 2004
		⇒ applications biotechnologiques	
	◦ forte affinité pour PS exposées à la surface des cellules	→ détecter l'apoptose et l'activation plaquettaire : suite aux modifications de l'architecture de la membrane plasmique (AnxA5 + dérivés marqués, fluorescents)	Dachary-Prigent <i>et al.</i> , 1993 Koopman <i>et al.</i> , 1994 Boersma <i>et al.</i> , 2005

AnxA5 : annexine A5, Ca^{2+} : ion calcium, Cl^- : ion chlorure, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, IC : insuffisance cardiaque

Na^+ : ion sodium, (c/n)PKC : protéine kinase C (conventionnelle/nouvelle), PLA_2 , PLC : phospholipase A_2 , phospholipase C

PS : phosphatidylsérine, réseaux 2D : réseaux bidimensionnels, VM : vésicules matricielles, wt : *wild-type*

→ modèles cellulaires : référencés en page 19 du manuscrit

Une expression abondante de l'AnxA5 a été observée dans des cellules CF. Elle activerait la signalisation calcique par la formation de canaux calciques dans la membrane plasmique, améliorant les courants Cl^- calcium-dépendants (Della Gaspera *et al.*, 1995, Pollard *et al.*, 2005). Autre fait intéressant, le NBD1 du CFTR est capable d'interagir de manière sélective avec les PS, laissant suggérer une possible codistribution entre la protéine canal et l'AnxA5 (Eidelman *et al.*, 2002). Au sein de notre laboratoire, l'AnxA5 a été identifiée comme partenaire direct de la protéine CFTR (Trouvé *et al.*, 2007). Ces travaux montrent que la présence de cette protéine est nécessaire à une sécrétion ionique correcte, médiée par le canal CFTR, dans des cellules épithéliales pulmonaires. Par ailleurs, la surexpression de l'AnxA5 dans des cellules exprimant le mutant F508del de la protéine CFTR entraîne une hausse des courants Cl^- AMPc-dépendants, laquelle corrèle avec une augmentation de la quantité de canaux dans la membrane plasmique (Le Drévo *et al.*, 2008). Au vu des différentes propriétés décrites pour l'AnxA5, notamment sa liaison avec les filaments d'actine et son implication dans la régulation de l'organisation et de la dynamique des membranes, cette protéine pourrait influencer les sécrétions ioniques dépendantes du canal CFTR en favorisant sa présence dans la membrane plasmique (augmentation de sa stabilité apicale) (Le Drévo *et al.*, 2008). Les observations relatives au CFTR-F508del sous-entendent que l'AnxA5 stabiliserait dans la membrane plasmique les mutants ayant échappés naturellement au contrôle de qualité mis en place dans le RE. Il est possible d'imaginer que la formation d'un complexe macromoléculaire entre le CFTR et l'AnxA5 dans le compartiment apical limiterait l'adressage des protéines mutées vers la voie de dégradation lysosomale. Des travaux menés par Faria et collaborateurs témoignent aussi de ce lien fonctionnel entre l'AnxA5 et le canal CFTR. Néanmoins, cette régulation ne passerait pas par une interaction directe entre les deux protéines (Faria *et al.*, 2010).

Les différentes études témoignant d'un lien entre les annexines et la protéine CFTR sont résumées dans le **Tableau VII**. Ce dernier permet de rendre compte plus facilement des principaux résultats obtenus et des différentes interprétations des auteurs.

Tableau VII : Récapitulatif des différentes études témoignant d'un lien entre les annexines et la protéine CFTR (1/4)

Modèles d'étude	Annexines impliquées	Principales observations	Conséquences ou Mécanismes d'action	Références
alignements de séquences (banque SWISS-PROT)	annexine A1 - annexine A8	◦ homologie entre le site de phosphorylation par la PKC de certaines Anx et le segment peptidique qui précède la F508 du CFTR → résidu F508 hautement conservé parmi les Anx ◦ segment 500-529 du CFTR peut être aligné avec la séquence de 8 Anx différentes : degré d'homologie compris entre 47 % (AnxA3) et 37 % (AnxA1 et AnxA8)	◦ homologie entre CFTR (NBD1) et Anx suggérerait : 1- localisations subcellulaires semblables (espace sous-membranaire ?) 2- interactions communes du CFTR et des Anx avec certains composés cellulaires	Chap <i>et al.</i> , 1991
lignée T84 (<i>in vitro</i>)	annexine A4	◦ AnxA4 concentrée à la membrane apicale ◦ AnxA4 exogène : perturbation de l'activation des courants Cl⁻ Ca²⁺-dépendants (patch-clamp) → effet contrecarré par Ac anti-AnxA4 et la diminution de l'expression endogène de l'AnxA4 par AON	◦ AnxA4 impliquée dans la modulation de l'activité de canaux ioniques → régulation de la conductance Cl⁻ activée par le Ca²⁺ (oligomérisation de l'AnxA4 près des canaux Cl⁻, inhibition de la phosphorylation des canaux Cl⁻ Ca²⁺-dépendants par la CaM kinase II)	Kaetzel <i>et al.</i> , 1994 Chan <i>et al.</i> , 1994
lignées 56FHTe8o-, NT-1 & CFT-1, CFT-2 (<i>in vitro</i>)	annexine A1 annexine A2 annexine A5 annexine A6	◦ AnxA5 surexprimée dans les lignées CFT-1 et CFT-2, mais expression des AnxA1 et AnxA2 non modifiée → surexpression de l'AnxA5 observée au niveau messenger et protéique	1- AnxA5 présenterait une régulation indépendante des autres Anx (lorsque le gène <i>CFTR</i> est muté) 2- la surexpression de l'AnxA5 permettrait de compenser le défaut de sécrétion Cl⁻ AMPc-dépendante dans les cellules CF → activation de la signalisation calcique par l'AnxA5 (formation canaux calciques) et augmentation des courants Cl⁻ Ca²⁺-dépendants	Della Gaspera <i>et al.</i> , 1995
NBD1 recombinant (wt et F508del) L-Cells (wt et F508del) (<i>in vitro</i>)	/	◦ NBD1-wt interagit de manière sélective avec les PS ◦ discrimination entre PS et PC est importante pour l'expression membranaire du CFTR	◦ AnxA5 présente aussi une forte affinité pour les PS : codistribution possible avec le CFTR ? (suggestion non formulée par cette étude)	Eidelman <i>et al.</i> , 2002
lignée 1-5c-4 (« Chang ») (<i>in vitro</i>)	annexine A2	◦ interaction entre PA et AnxA2 à la surface des cellules ◦ AnxA2 : impliquée dans l'infection des cellules par PA ? → oui, invasion des cellules réduite lorsque PA pré-incubé avec AnxA2 recombinante avant l'infection	◦ identification d'un nouveau récepteur pour PA à la surface des cellules de mammifères → AnxA2 impliquée dans l'internalisation de PA et l'invasion bactérienne des cellules	Kirschnek <i>et al.</i> , 2005
lignées IB3-1 et IB3-1/S9 (<i>in vitro</i>)	annexine A3 annexine A5 (annexines A1, A2 et A7)	◦ analyse protéomique (électrophorèse 2D + spectrométrie de masse) → AnxA5 et AnxA3 identifiées dans les 194 protéines les plus abondantes dans les cellules CF	◦ protéome (forte abondance) des cellules CF : banque de données de référence pour les études de « médicaments candidats » ou encore pour la validation de différentes approches de thérapie génique du <i>CFTR</i>	Pollard <i>et al.</i> , 2005

Tableau VII : Récapitulatif des différentes études témoignant d'un lien entre les annexines et la protéine CFTR (2/4)

Modèles d'étude	Annexines impliquées	Principales observations	Conséquences ou Mécanismes d'action	Références
jeunes souris C57BL/6 (<i>cftr</i> ^{-/-} & <i>cftr</i> ^{+/+}) HNEC (non-CF & CF) (<i>in vitro</i> & <i>in vivo</i>)	annexine A1	- analyse protéomique à partir de cryptes (côlon) : spot AnxA1 non retrouvé sur gel 2D issu des souris <i>cftr</i>^{-/-} → l'absence de l'AnxA1 s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la cPLA₂ (dans côlon des souris <i>cftr</i>^{-/-}) - analyses IHC : AnxA1 non détectée dans côlon, poumon et pancréas des souris <i>cftr</i>^{-/-} vs <i>cftr</i>^{+/+} - analyses ICC (1) : AnxA1 absente ou expression très fortement réduite dans les cellules issues de patients CF (Y122X/Y122X, 489delC/498delC) - analyses ICC (2) : AnxA1 présente dans les cellules issues de patients CF (F508del/F508del), expression réduite et dépendante du phénotype (modéré/sévère)	- l'absence de CFTR entraîne une diminution de l'expression de l'AnxA1 → la régulation négative de l'AnxA1 par le CFTR serait post-transcriptionnelle - AnxA1 = protéine protectrice cruciale pour le maintien de l'homéostasie et la réparation des tissus après un épisode inflammatoire - AnxA1 = protéine clé impliquée dans la pathogenèse de la mucoviscidose, notamment dans l'inflammation → expression diminuée de l'AnxA1 contribue à la détérioration du phénotype CF	Bensalem <i>et al.</i> , 2005
lignée 16HBE14o- HNEC (non-CF) biopsies intestinales humaines (non-CF) (<i>in vitro</i>)	AnxA2-S100A10	- interaction entre le complexe AnxA2-S100A10 et le CFTR → formation AMPc/PKA-dépendante - complexe AnxA2-S100A10 se lie au CFTR inséré dans la MP et CaN impliquée dans la formation du macrocomplexe AnxA2-S100A10/CFTR - formation du complexe AnxA2-S100A10 perturbée = sécrétion Cl⁻ via CFTR atténuée	- l'interaction fonctionnelle entre le complexe AnxA2-S100A10 et le CFTR est AMPc/PKA/CaN-dépendante → le complexe macromoléculaire AnxA2-S100A10/CFTR est important pour la régulation de la fonction du canal CFTR dans les épithelia	Borthwick <i>et al.</i> , 2007 Muimo, 2009
tissu bronchique et nasal humain (non-CF) NBD1-His, CFTR-His (wt & F508del) lignée A549 (wt & F508del) (<i>in vivo</i> & <i>in vitro</i>)	annexine A5	- CFTR et AnxA5 présents dans un même complexe (co-IP), interaction directe entre l'AnxA5 et le domaine NBD1 du CFTR (overlay et SPR) → interaction directe, Ca²⁺-dépendante, non altérée par la mutation F508del - flux d'halogénures (I⁻) via le CFTR sont dépendants du niveau d'expression intracellulaire d'AnxA5 [microcytofluorométrie dynamique (SPQ)] - modulation de l'expression de l'AnxA5 affecte la quantité de CFTR présent dans la MP - AnxA5 ne modifie pas l'état de phosphorylation du CFTR par la PKA (études <i>in vitro</i>) - CFTR et AnxA5 partiellement codistribuées dans les cellules épithéliales bronchiques humaines non-CF (région apicale)	- lien fonctionnel entre le CFTR et l'AnxA5 - AnxA5 est nécessaire à une sécrétion ionique correcte, médiée par le canal CFTR, dans des cellules épithéliales pulmonaires - AnxA5 favorise la présence du CFTR à la surface cellulaire (AnxA5 impliquée dans l'intégration du canal CFTR dans la membrane plasmique ?) → AnxA5 = nouvelle cible thérapeutique potentielle ?	Trouvé <i>et al.</i> , 2007

Tableau VII : Récapitulatif des différentes études témoignant d'un lien entre les annexines et la protéine CFTR (3/4)

Modèles d'étude	Annexines impliquées	Principales observations	Conséquences ou Mécanismes d'action	Références
lignées 16HBE14o- & CFBE41o- HNEC (non-CF) souris CFTR-wt & CFTR-F508del (Cftr ^{tm2Cam}) (<i>in vitro</i> & <i>in vivo</i>)	AnxA2-S100A10	◦ stimulation Fsk/IBMX n'induit pas la formation du complexe AnxA2-S100A10/CFTR dans les cellules CF (+ absence du complexe AnxA2-S100A10) ◦ défaut d'activation de la CaN par la PKA dans les cellules CF entraîne un défaut de déphosphorylation de l'AnxA2 ◦ distribution subcellulaire de l'AnxA2 et de S100A10 différente entre cellules CF et non-CF → cellules CF : colocalisation de l'AnxA2 et de S100A10 à la MP pas évidente (Fsk/IBMX) ◦ expression de l'AnxA2 augmentée dans la trachée des souris CF	1- défaut de formation du complexe AnxA2-S100A10/CFTR-F508del = signalisation AMPc/PKA/CaN défectueuse dans les cellules CF 2- l'absence de formation du complexe macromoléculaire pourrait expliquer le défaut de sécrétion Cl⁻ AMPc/PKA-dépendante dans les cellules CFBE41o- ? → CFTR-wt requis pour la voie de signalisation AMPc/PKA/CaN et la formation du complexe AnxA2-S100A10 dans les épithelia	Bebok <i>et al.</i> , 2005 Borthwick <i>et al.</i> , 2008b Muimo, 2009
lignée A549 (wt & F508del) lignées 16HBE14o- & CFBE41o- (<i>in vitro</i> & <i>in vivo</i>)	annexine A5	◦ CFTR-F508del et AnxA5 présents dans un même complexe protéique (co-IP) ◦ sécrétions ioniques (AMPc-dépendantes), via le CFTR-F508del, corrélées avec le niveau d'expression intracellulaire de l'AnxA5 ◦ surexpression de l'AnxA5 dans cellules CF améliore l'effet d'un traitement Tg seul ($\uparrow [Ca^{2+}]_i$) sur les courants médiés par le CFTR (stimulés par cocktail IBMX/Fsk) (patch-clamp) ◦ modulation de l'expression de l'AnxA5 régule la quantité de canaux CFTR (wt et F508del) présent dans la MP	◦ au vu de ses propriétés, l'AnxA5 appartiendrait au réseau 3D « CFTR-MP-cytosquelette cortical » ◦ AnxA5 régule l'expression à la surface cellulaire du CFTR (wt et F508del) en améliorant sa présence dans la MP ◦ AnxA5 influencerait la sécrétion Cl⁻ AMPc-dépendante en impactant la stabilité des canaux CFTR (wt et F508del) dans la MP	Le Drévo <i>et al.</i> , 2008
souris C57BL/6 (cftr ^{-/-} , anxA1 ^{-/-} , wt) leucocytes PMNs (humains & murins) (<i>in vitro</i> & <i>in vivo</i>)	annexine A1	◦ CFTR_{inh-172} exacerbe la péritonite induite par zymosan → effet associé avec expression d'AnxA1 endogène plus faible dans les neutrophiles et les macrophages (résultats similaires en utilisant l'inhibiteur GlyH101) ◦ effet pro-inflammatoire du CFTR_{inh-172} perdu chez les animaux anxA1^{-/-} et cftr^{-/-} ◦ hrAnxA1 chez les animaux cftr^{-/-} ou traités avec CFTR_{inh-172} corrige la migration exagérée des leucocytes ◦ traitement des PMN humains avec CFTR_{inh-172} réduit le niveau d'expression intracellulaire de l'AnxA1 en induisant sa libération dans le compartiment extracellulaire	◦ connexion fonctionnelle entre le CFTR et l'AnxA1 <u>modèle souris</u> : réponse inflammatoire associée à l'inhibition du CFTR est liée à une dérégulation de la voie de l'AnxA1 AnxA1 = cible pharmacologique pour le contrôle du phénotype inflammatoire chez les patients CF	Dalli <i>et al.</i> , 2010

Tableau VII : Récapitulatif des différentes études témoignant d'un lien entre les annexines et la protéine CFTR (4/4)

Modèles d'étude	Annexines impliquées	Principales observations	Conséquences ou Mécanismes d'action	Références
NBD1-His	annexine A5	◦ AnxA5 identifiée comme CIP putative suite à l'analyse protéomique (complexes NBD1-CIP) ◦ augmentation des courants médiés par le CFTR, dans HEK-293 co-exprimant CFTR-wt + AnxA5 (patch-clamp) → non observée pour HEK-293 co-exprimant CFTR-F508del + AnxA5	◦ régulation positive du canal CFTR par l'AnxA5	Faria <i>et al.</i> , 2010
lignées Calu-3, HEK-293, HeLa, BHK-21 et H441		analyse ICC : HEK-293 et HeLa transfectées avec mCherry-CFTR (wt & F508del) +/- GFP-AnxA5 → absence de colocalisation entre l'AnxA5 et le CFTR (wt & F508del), même avec de fortes $[Ca^{2+}]_i$ ◦ co-IP CFTR/AnxA5 et AnxA5/CFTR (BHK CFTR-wt transfectées avec AnxA5) :	1- AnxA5 module les sécrétions ioniques médiées par le canal CFTR en interférant avec son internalisation (inhibition de l'endocytose) → en accord avec le rôle décrit des Anx : formation de plateformes d'échafaudage au niveau des membranes cellulaires (PS), implication dans la dynamique des membranes (réduction de la mobilité des protéines membranaires)	
(<i>in vitro</i>)		CFTR et AnxA5 retrouvés dans un même complexe mais interaction serait non spécifique ◦ H441 transfectées avec siRNA-AnxA5 → baisse de la sécrétion Cl^- dépendante du CFTR (chambre de Ussing)	AnxA5 = stabiliserait le canal CFTR dans la MP en l'attachant au cytosquelette d'actine sous-membranaire 2- AnxA5 impliquée dans la régulation de la fonction canal ionique du CFTR-wt, mais absence d'interaction spécifique entre les 2 protéines [<i>in vitro</i> (+), <i>in vivo</i> (-)]	

Ac : anticorps, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, Anx : annexine, hrAnxA1 : AnxA1 humaine recombinante, AON : oligonucléotides antisens (*antisense oligonucleotides*)

CaM protéine kinase II : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, CaN : calcineurine

cellules CF : qui expriment le CFTR-F508del, CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR_{inh-172} : inhibiteur du CFTR, Ca^{2+} : ion calcium, Cl^- : ion chlorure

CIP : *CFTR interacting protein*, co-IP : co-immunoprécipitation, conductance Cl^- : conductance chlorure, courants Cl^- : courants chlorure, cPLA₂ : phospholipase A₂ cytosolique

3D : tridimensionnel, électrophorèse 2D : électrophorèse bidimensionnelle, Fsk : forskoline, IBMX : *3-isobutyl-1-methylxanthine*, IHC/ICC : immunohistochimie/immunocytochimie

leucocytes PMNs : leucocytes polymorphonucléaires, MP : membrane plasmique, NBD1 : domaine 1 de liaison aux nucléotides (*nucleotide binding domain*)

PKA/PKC : protéine kinase A & C, PA : *Pseudomonas aeruginosa*, PS : phosphatidylsérine, PC : phosphatidylcholine

sécrétion Cl^- : sécrétion d'ions Cl^- , siRNA : *small interfering RNA*, SPQ : 6-methoxy-N-(3-sulfopropyl) quinolinium, SPR : résonance plasmonique de surface (*surface plasmon resonance*)

Tg : thapsigargine, wt : sauvage (*wild-type*)

→ modèles cellulaires : référencés en page 19 du manuscrit

Les travaux menés par le groupe de M.D. Amaral rapportent une régulation positive du canal CFTR par l'AnxA5 dans les cellules de mammifères (Faria *et al.*, 2010). Ils observent, par patch-clamp, une augmentation des courants médiés par le CFTR dans des cellules HEK-293 co-exprimant le CFTR-wt et l'AnxA5, au regard de cellules exprimant uniquement le CFTR-wt. L'utilisation de mutants du CFTR (Y1424A/I1427A) ainsi que de molécules affectant son endocytose (dynasore) a permis aux auteurs de suggérer que l'AnxA5 améliorerait la fonction canal chlorure du CFTR en interférant avec son internalisation. L'importance de l'expression de l'AnxA5 pour une sécrétion correcte des ions Cl⁻ à travers les épithélia a également été validée dans les cellules H441. Ces dernières ont été cultivées sur des supports perméables permettant leur exploitation en chambre de Ussing. La transfection préalable de ces cellules avec un siRNA diminuant l'expression endogène de l'AnxA5 réduit de manière significative le courant de court-circuit (I_{sc}) activé par le cocktail IBMX/Fsk. En ce sens, ces observations confirment celles faites lors de nos travaux dans les cellules A549 transfectées de manière stable avec le CFTR-wt (Trouvé *et al.*, 2007, Le Drévo *et al.*, 2008). Cependant, il s'avère que, dans leurs modèles, la co-expression du CFTR-F508del et de l'AnxA5 n'améliore pas les sécrétions ioniques dépendantes du canal CFTR. Ces observations vont à l'encontre de celles que nous avons pu faire pour les cellules A549 exprimant de manière stable le CFTR-F508del et les cellules CFBE41o-.

Un autre point divergent entre ces études est l'association directe entre la protéine CFTR et l'AnxA5. Bien que Faria et associés identifient l'AnxA5 comme CIP (*CFTR interacting protein*) putative à la suite de leur analyse protéomique, ils ne retrouvent pas la codistribution partielle observée lors de nos marquages sur tissus bronchiques humains. L'utilisation des modèles HEK-293 et HeLa co-exprimant le mCherry-CFTR (wt ou F508del) et l'AnxA5 couplée à la GFP ne leur a pas permis d'observer une colocalisation significative entre les deux protéines, même à la suite d'un traitement avec la ionomycine. Rappelons que cette molécule (ionophore), en augmentant la concentration intracellulaire de calcium, induit une forte mobilisation de l'AnxA5 à la membrane plasmique. De plus, ils ne montrent aucune amélioration de la présence du CFTR-F508del à la membrane plasmique lorsque celui-ci est co-exprimé avec l'AnxA5. Bien que les données n'apparaissent pas dans l'étude, la technique FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) a été mise en œuvre. Une nouvelle fois les auteurs rapportent l'absence d'interaction *in vivo* entre les deux protéines. Enfin, l'étude de l'interaction *in vitro* entre l'AnxA5 et le CFTR a été entreprise avec la technique de co-immunoprécipitation (co-IP), utilisant des lysats issus de cellules BHK-21 transfectées de manière stable avec le CFTR-wt et de manière transitoire avec l'AnxA5. Bien que les auteurs observent une faible bande correspondante à l'AnxA5 (co-IP CFTR/AnxA5) et au CFTR (co-IP AnxA5/CFTR), ils affirment que ces résultats sont peu convaincants pour conclure à une association significative entre les deux protéines (Faria *et al.*, 2010). Menées dans notre laboratoire à partir de lysats de tissu nasal et des lignées A549 (wt et F508del), des expériences de co-IP montrent la présence du CFTR (wt et F508del) et de l'AnxA5 dans un même complexe protéique. Des expériences d'overlay réalisées à partir du NBD1-wt, du CFTR-wt purifiés et de l'AnxA5 pure rapportent une interaction directe entre les deux protéines. L'utilisation de la SPR confirme le couplage physique, calcium-dépendant, entre le canal CFTR et l'AnxA5 et l'engagement du NBD1 dans cette liaison. Ces différentes techniques

précisent aussi que la mutation F508del n'altère en rien cette association (Trouvé *et al.*, 2007, Le Drévo *et al.*, 2008).

Ces études s'accordent sur le potentiel de l'AnxA5 dans la régulation positive du canal CFTR-wt. L'explication principale proposée par ces auteurs va également dans le même sens : par sa liaison au cytosquelette d'actine sous-membranaire et son impact sur la dynamique des membranes, l'AnxA5 modulerait les sécrétions ioniques médiées par le CFTR en favorisant sa présence dans la membrane plasmique (interfère avec son internalisation). Cependant, ces travaux divergent quant à l'impact de l'AnxA5 sur le mutant F508del de la protéine CFTR. En effet, nous montrons que la surexpression de l'AnxA5 dans les cellules A549-F508del et CFBE41o- conduit à une élévation des flux d'halogénures (I⁻) et/ou des courants médiés par le CFTR ainsi qu'à une augmentation de la quantité de canaux dans la membrane plasmique. Cependant, cela n'est pas retrouvé dans le modèle cellulaire utilisé par l'équipe de M.D. Amaral. De plus, bien qu'ils identifient l'AnxA5 comme CIP putative, les auteurs ne confirment pas la codistribution partielle (*in vivo*) et l'interaction directe (*in vitro*) entre ces deux protéines.

Quelques éléments pourraient permettre d'expliquer les différences observées, et notamment le type cellulaire utilisé. En effet, concernant les travaux de Faria et associés, la régulation des courants dépendants du canal CFTR par l'AnxA5 a été étudiée dans des cellules HEK-293 co-exprimant le CFTR (wt et F508del) et l'AnxA5 de manière transitoire. Quant aux modèles utilisés dans le cadre des études de Trouvé *et al.*, et Le Drévo *et al.*, il s'agissait des lignées A549, transfectées de manière stable avec le CFTR (wt ou F508del) et CFBE41o-, exprimant de façon endogène le CFTR-F508del. De plus, en fonction de l'étude, les cellules ont été utilisées entre 24 heures et 72 heures après la transfection (surexpression de l'AnxA5). Les divergences observées lors des expériences de co-IP pourraient être dues à l'utilisation de billes recouvertes de protéine G différentes. Par ailleurs, Faria *et al.*, concluent, à la suite de la co-IP CFTR/AnxA5, que la bande observée ne peut être considérée comme spécifique puisqu'elle est également retrouvée pour le témoin négatif (billes G sans anticorps). Cependant, une remarque peut être faite quant à la validité de ce témoin négatif puisque qu'une bande correspondant à la chaîne légère des immunoglobulines y est observée. Enfin, l'anticorps anti-AnxA5 utilisé dans l'étude de Faria *et al.*, est aussi sujet à discussion puisque, d'après ses caractéristiques, il est également capable de reconnaître les annexines A4 et A6.

Au vu des différentes observations faites au sein de notre laboratoire, une approche thérapeutique pourrait être l'identification de molécules capables de moduler positivement l'expression de l'AnxA5 dans des cellules épithéliales exprimant le CFTR-F508del, sans en affecter leur survie. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de recherche, et d'après les données de la littérature, la gonadolibérine ou GnRH, molécule utilisée en thérapeutique humaine depuis plus de 25 ans, apparaît comme un candidat potentiel.

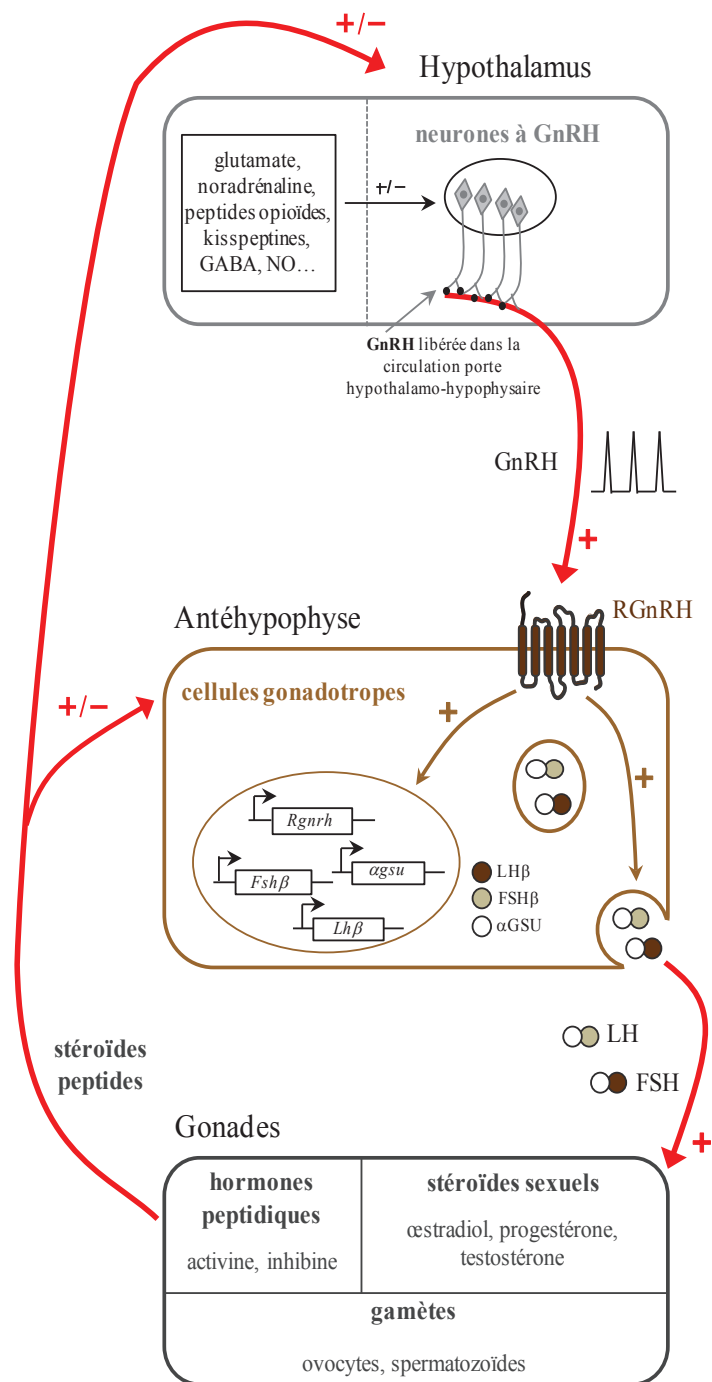


Figure 43 : Représentation simplifiée de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique de mammifères

FSH : *follicle-stimulating hormone*, FSHβ : sous-unité β spécifique de la FSH, GABA : acide γ-aminobutyrique, GnRH : *gonadotropin-releasing hormone*, LH : *luteinizing hormone*, LHβ : sous-unité β spécifique de la LH, NO : monoxyde d'azote, RGNRH : récepteur de la GnRH, αGSU : sous-unité α commune des hormones glycoprotéiques (*alpha-glycoprotein hormone subunit*)

adaptée de la thèse de A.L. Schang, 2011 (tel-00633501, version 1 - 18 Oct 2011)

Partie 4. La GnRH et son récepteur (RGnRH)

La GnRH est l'acteur clé de la régulation de la fonction de reproduction chez les mammifères (**Figure 43**). C'est une neurohormone sécrétée par certains neurones de l'hypothalamus, les neurones à GnRH. Elle est libérée de façon pulsatile dans le système porte hypothalamo-hypophysaire et véhiculée jusqu'à l'hypophyse antérieure. Par sa liaison spécifique sur son récepteur de haute affinité, la GnRH contrôle la synthèse et la sécrétion des gonadotropines LH (*luteinizing hormone*) et FSH (*follicle-stimulating hormone*) par les cellules gonadotropes. Déversées dans la circulation générale, ces dernières vont réguler la gamétogenèse et la stéroïdogénèse dans les gonades. Chez les femelles, de fortes concentrations plasmatiques de LH induisent l'ovulation et, de ce fait, la transformation du follicule en corps jaune. Chez les mâles, elle permet la synthèse des androgènes par les cellules de Leydig. Dans l'ovaire, la FSH est impliquée dans la croissance folliculaire et dans le testicule, elle stimule le processus de spermatogenèse. Enfin, les hormones gonadiques, et notamment les stéroïdes sexuels, peuvent exercer un rétrocontrôle positif ou négatif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. Ces trois niveaux constituent l'axe HHG.

Le récepteur de la GnRH (RGnRH), exprimé à la surface des cellules gonadotropes de l'antéhypophyse, occupe une position essentielle dans le contrôle de la fonction de reproduction. En décodant les fluctuations physiologiques de GnRH, il va permettre la mise en place de réponses biologiques adaptées (Counis *et al.*, 2009). Le RGnRH appartient à la superfamille des RCPG et présente une particularité étonnante : l'absence d'une queue C-terminale intracytoplasmique, normalement engagée dans la désensibilisation homologue des autres récepteurs de cette famille.

1. Physiologie de l'axe hypothalamo-hypophysaire

C'est dans le complexe hypothalamo-hypophysaire de mammifères qu'ont initialement été identifiés la GnRH et son récepteur. Ces deux entités constituent le système GnRH de type I.

1.1. La GnRH de mammifères

Son existence avait déjà été suggérée dès 1950 par les travaux de G. Harris (Harris, 1950), mais ce n'est qu'au début des années 70 que sa présence dans l'hypothalamus de porc et de mouton a été démontrée. La séquence de la GnRH mammalienne a ainsi été proposée dès 1971 par les groupes de A. Schally (Matsuo *et al.*, 1971) et de R. Guillemin (Amoss *et al.*, 1971). Depuis, de nombreux travaux ont pu rapporter son rôle crucial dans le contrôle de la fonction de reproduction.

Elle fut en premier lieu dénommée LHRH (*luteinizing hormone-releasing hormone*), du fait de sa capacité à stimuler la sécrétion de LH. Par la suite c'est le terme GnRH, pour *gonadotropin-releasing hormone*, qui a été employé puisqu'il s'est avéré que cette hormone était également capable de stimuler la sécrétion d'une autre gonadotropine, la FSH.

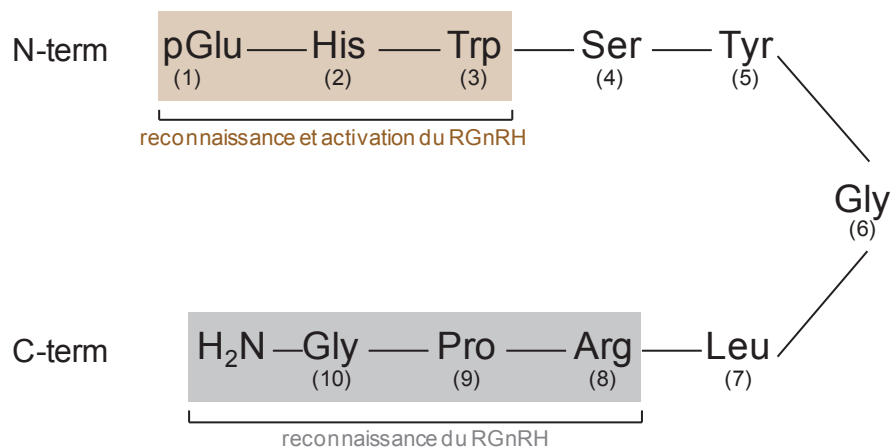


Figure 44 : Représentation schématique de la structure de la GnRH mammalienne

GnRH : *gonadotropin-releasing hormone*, RGnRH : récepteur de la GnRH

adaptée de la revue de Millar *et al.*, 2004 et de Derman *et al.*, 2004 (<http://www.glowm.com>, Volume 5, Chapitre 8)

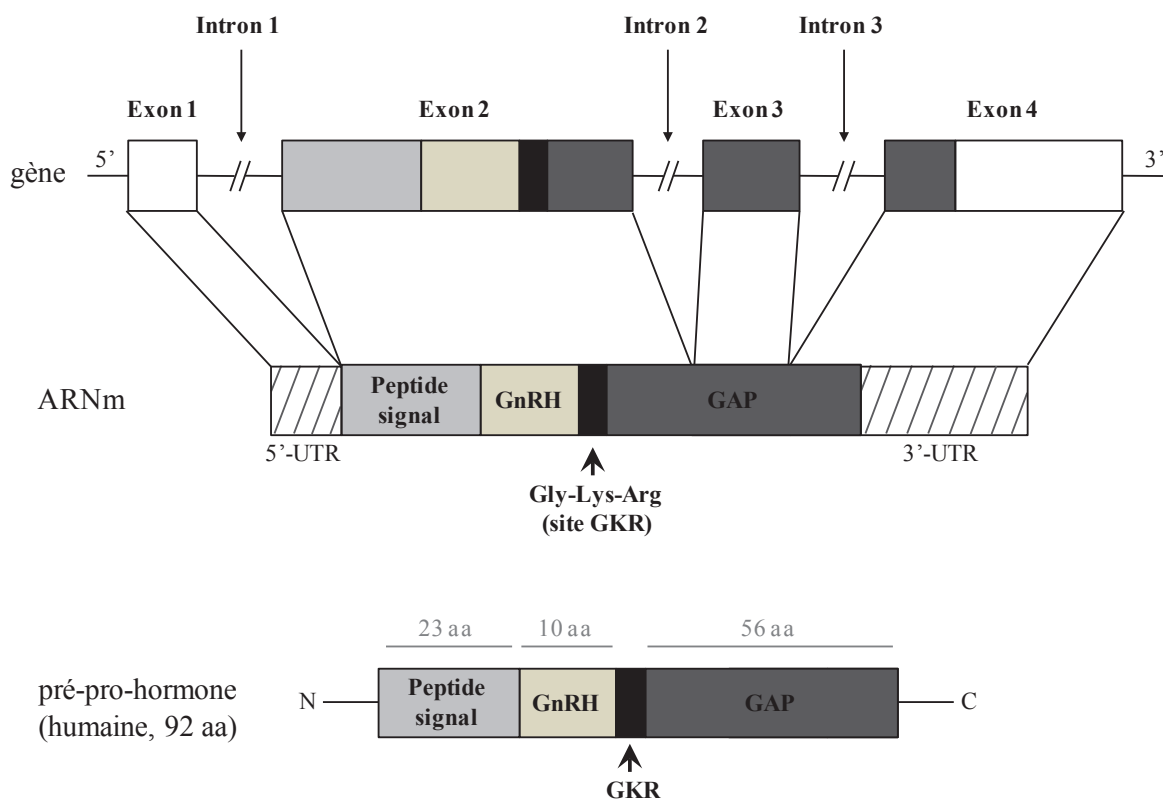


Figure 45 : Représentation schématique de la structure du gène et de l'ARNm de la GnRH de mammifères

aa : acides aminés, ARNm : ARN messenger, GAP : *GnRH-associated peptide*, GnRH : *gonadotropin-releasing hormone*, GKR : glycine-lysine-arginine, UTR : *untranslated region*

adaptée de Nikolics *et al.*, 1985

1.1.1. Structure et biosynthèse

La GnRH identifiée chez les mammifères est un décapeptide. De formule $\text{pyroGlu}^1\text{-His}^2\text{-Trp}^3\text{-Ser}^4\text{-Tyr}^5\text{-Gly}^6\text{-Leu}^7\text{-Arg}^8\text{-Pro}^9\text{-Gly}^{10}\text{-NH}_2$, elle présente une structure en épingle à cheveux courbée au niveau de la glycine en position 6 (**Figure 44**). Cette dernière offre à la GnRH une flexibilité essentielle à son activité biologique. Les extrémités N- et C-terminales sont engagées dans la liaison avec le récepteur, mais seule la portion N-terminale joue un rôle important dans l'activation du RGnRH (pour revue : Millar *et al.*, 2008).

Chez l'Homme, la GnRH est codée par un petit gène (5.1 kb) situé sur le bras court du chromosome 8 (Hayflick *et al.*, 1989, Radovick *et al.*, 1990). Ce gène est organisé en quatre exons et trois introns (**Figure 45**). La traduction de l'ARNm conduit à un peptide précurseur de 92 acides aminés, la pré-pro-GnRH, composé d'un peptide signal, du décapeptide GnRH, d'un site de clivage glycine-lysine-arginine (GKR) et du GAP (*GnRH-associated peptide*) (pour revue : Seeburg *et al.*, 1987) (**Figure 45**). La maturation post-traductionnelle de la pré-pro-hormone permet l'élimination du peptide signal et la séparation de la GnRH du GAP. Cette dernière est réalisée par une pro-hormone convertase reconnaissant le site de clivage GKR. La maturation de la GnRH se caractérise également par la cyclisation en pyroglutamate de la glutamine N-terminale et l'amidation de la glycine C-terminale. Ces modifications post-traductionnelles sont indispensables à l'activité biologique de l'hormone.

La synthèse de la GnRH a lieu dans certains neurones hypothalamiques, les neurones à GnRH, dont le nombre chez l'être humain varie entre 1000 et 2000 en fonction des études (pour revues : Beauvillain, 2008, Naor, 2009).

1.1.2. Sécrétion pulsatile et régulée de la GnRH

Les travaux pionniers menés par Dierschke et collaborateurs chez le macaque rhésus ont démontré un mode de sécrétion original de la GnRH (Dierschke *et al.*, 1970). Suite au processus de maturation de la pré-pro-hormone, les terminaisons nerveuses des neurones libèrent la GnRH de façon pulsatile et synchronisée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. La durée et la fréquence des décharges de GnRH varient entre les espèces. Elles durent, en général, quelques minutes et sont observées toutes les 30 à 120 minutes (pour revue : Naor, 2009). Chez la femme, la fréquence et l'amplitude des pulses de GnRH varient au cours du cycle menstruel. Ceci s'explique par les rétrocontrôles exercés par les hormones gonadiques sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

De nombreux paramètres influencent la concentration de GnRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire. À l'amplitude et à la fréquence des pulses s'ajoutent le taux de transcription du gène, le processus de maturation de la pré-pro-hormone ou encore le taux de dégradation du décapeptide. Ils constituent différents niveaux de régulation qui pourront se voir affecter par différents facteurs périphériques et centraux tels que les stéroïdes sexuels, la leptine, le couple kisspeptine/GPR54 (*KiSS1-derived peptide receptor*) ou encore certains neurotransmetteurs (pour revue : Kottler et Richard, 2008) (**Figure 43**).

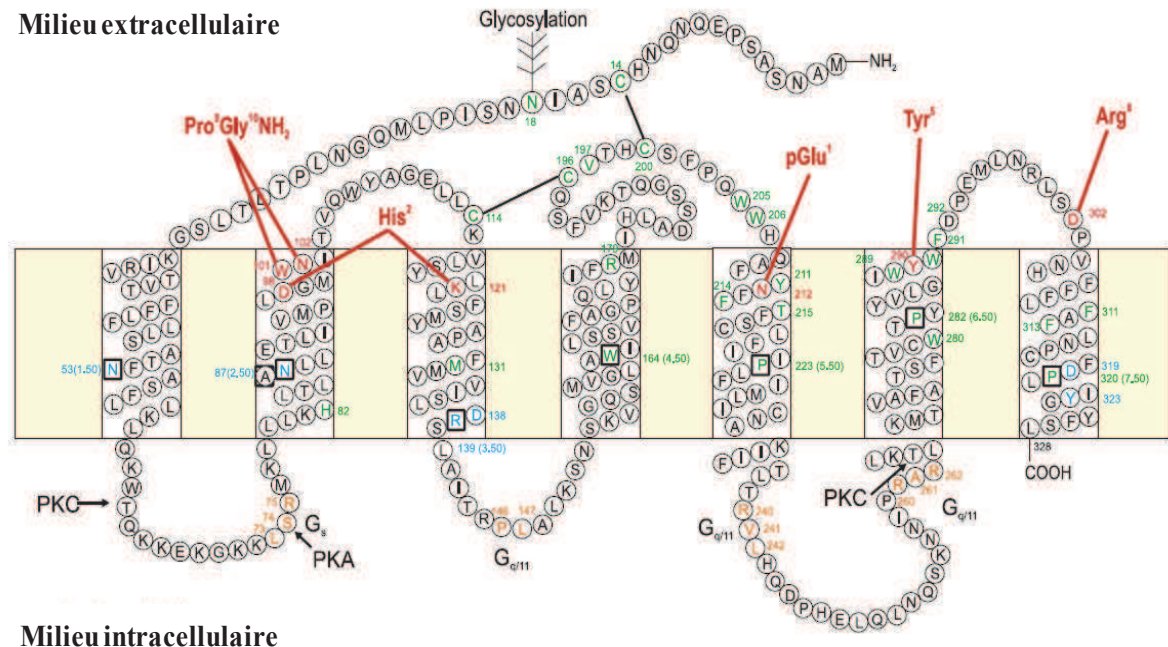


Figure 46 : Représentation schématique du récepteur de la GnRH humain

L'appartenance du RGNRH (type I) à la superfamille des RCPG a été confirmée à la suite d'études structurales comparatives. Les résidus impliqués dans la liaison du ligand ainsi que ceux primordiaux pour la structure du récepteur ou la configuration de la poche de liaison sont identifiés respectivement en rouge et en vert. Ces derniers incluent notamment les acides aminés engagés dans la formation des ponts disulfure stabilisateurs et le site de glycosylation. Les résidus impliqués dans l'activation du récepteur et dans le couplage aux protéines G sont visualisés respectivement en bleu et en orange. Enfin, les sites potentiellement phosphorylables par les protéines kinases A et C sont également indiqués. Les interactions intermoléculaires entre les acides aminés du décapeptide GnRH et le récepteur sont représentées par les lignes rouges.

GnRH : gonadotropin-releasing hormone, PKA / PKC : protéine kinase A / C, RCPG : récepteurs couplés aux protéines G, RGNRH : récepteur de la GnRH

d'après la revue de Millar et al., 2008

a. Facteurs périphériques : stéroïdes sexuels

L'activité des neurones à GnRH est fortement modulée par les hormones gonadiques, ces dernières pouvant exercer un rétrocontrôle négatif ou positif. Chez l'animal (mâle et femelle), la castration ou l'ovariectomie entraîne une élévation des ARNm codant la GnRH ainsi qu'une augmentation de la sécrétion du décapeptide (Levine et Duffy, 1988). Chez les femelles, l'augmentation massive des taux d'œstradiol enregistrée avant l'ovulation corrèle avec une élévation des ARNm codant la GnRH et de la fréquence des pulses, aboutissant *in fine* au pic préovulatoire de LH.

Afin de pouvoir intégrer les messages stéroïdiens, la présence de récepteurs aux hormones stéroïdes sur les neurones à GnRH s'avère un prérequis essentiel. Bien que longtemps controversée, l'existence de récepteurs spécifiques à l'œstradiol (ER- β , *estrogen receptor*) sur un nombre restreint de neurones à GnRH semble aujourd'hui acceptée. En revanche, le mode de régulation par la testostérone n'est pas encore tout à fait clarifié (pour revue : Kottler et Richard, 2008).

b. Facteurs centraux : neurotransmetteurs

La régulation de l'activité des neurones à GnRH fait également intervenir de nombreux facteurs centraux. Parmi les neurotransmetteurs les mieux décrits peuvent être cités : le glutamate, le GABA (acide γ -aminobutyrique), la noradrénaline, les opiacés ou encore le monoxyde d'azote (NO, *nitric oxide*). Des études rapportent que ces neurotransmetteurs sont capables de stimuler ou de réprimer la transcription du gène codant la GnRH et la libération du décapeptide (Gore et Roberts, 1997, pour revue : Kottler et Richard, 2008).

1.2. Le récepteur de la GnRH (RGnRH)

Bien que la structure de la GnRH ait été résolue en 1971, il a fallu attendre 1992 pour la caractérisation de son récepteur hypophysaire. La compréhension des mécanismes de régulation de la fonction de reproduction par la GnRH a été considérablement améliorée suite au clonage de l'ADNc du RGnRH.

1.2.1. Structure du RGnRH

La séquence primaire du RGnRH est hautement conservée entre les mammifères (~ 85 %). Chez l'Homme, celle-ci est composée de 328 résidus (Kakar *et al.*, 1992). Le RGnRH présente des traits structuraux caractéristiques des RCPG (**Figure 46**) : une chaîne polypeptidique unique constituée de sept domaines transmembranaires reliés entre eux par des boucles intracytoplasmiques et extracellulaires. Des études structurales suggèrent une organisation alpha-hélicoïdale des sept domaines transmembranaires, lesquels s'arrangent en un faisceau présentant au centre une poche hydrophile (Baldwin, 1993, pour revue : Kakar *et al.*, 2004).

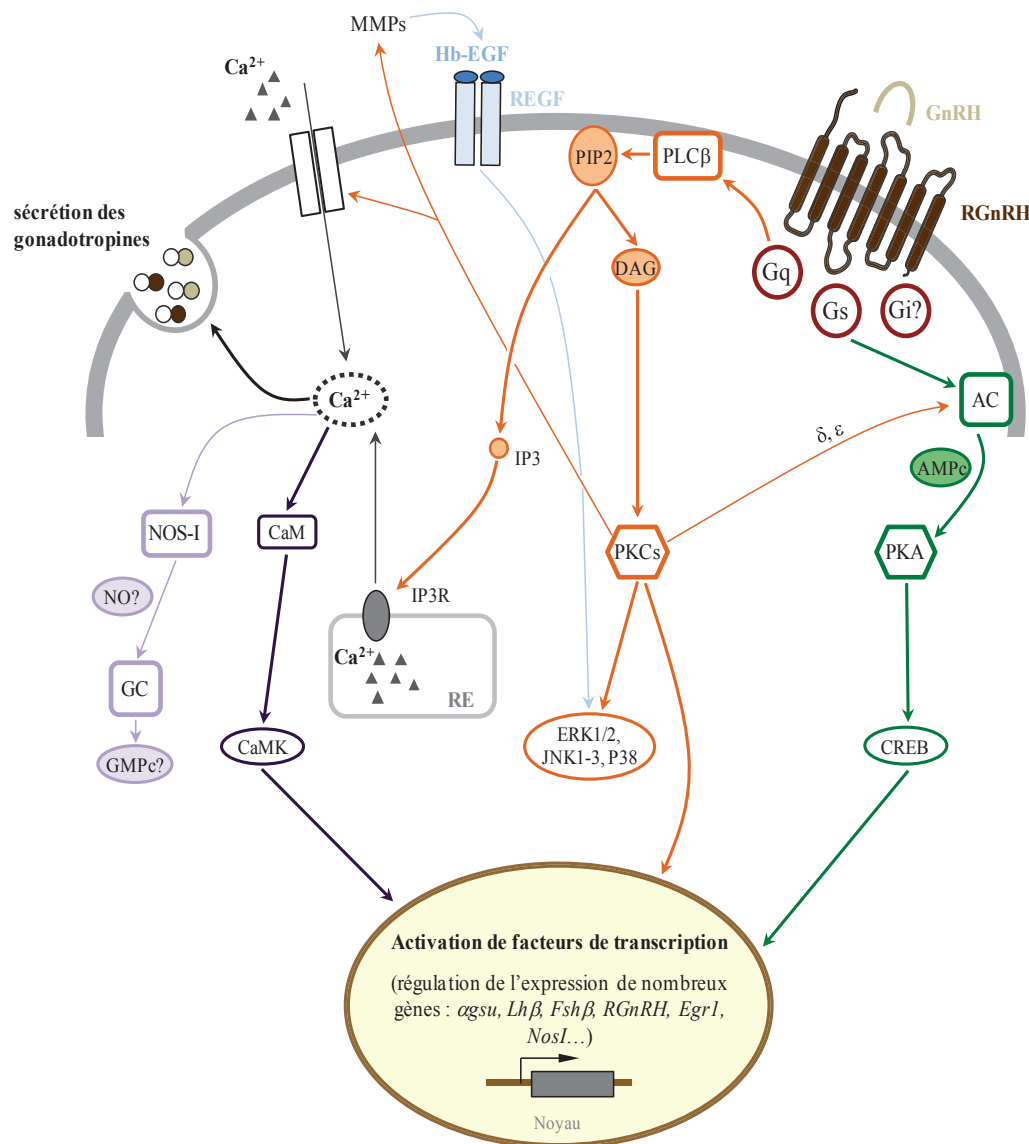


Figure 47 : Modèle décrivant les différentes voies de signalisation associées au RGnRH dans les cellules gonadotropes

La majorité des modèles établis à ce jour décrit le couplage quasi-exclusif du RGnRH à la protéine $G_{\alpha q/11}$, initiant la cascade de signalisation classique Ca^{2+}/DAG -PKCs-MAPKs (orange).

L'activation des MAPKs de type ERK peut également s'expliquer par la transactivation du récepteur à l'EGF (bleu clair), un processus déjà décrit pour de nombreux RCPG (Daub *et al.*, 1996, Prenzel *et al.*, 1999). Ce dernier impliquerait la libération de facteurs de croissance apparentés à l'EGF, tels que le Hb-EGF, par des métalloprotéases (MMPs) dans la matrice extracellulaire. Principal médiateur de la sécrétion des gonadotropines LH et FSH, le calcium entraîne également l'activation de la CaMK (violet foncé) et stimulerait la NOS-I (violet clair). Cette dernière serait impliquée dans l'activation d'une guanylate cyclase (GC) conduisant à la production de GMPc (Lozach *et al.*, 1998, Garrel *et al.*, 1998). Les besoins en calcium pour l'activation de la PKC n'apparaissent pas sur ce schéma.

Le couplage du RGnRH avec la sous-unité $G_{\alpha s}$ et l'activation de l'adénylate cyclase (AC) seraient quant à eux responsables de la mise en place de la voie AMPc/PKA/CREB (vert), CREB étant un facteur de transcription activé en dehors du noyau.

AC : adénylate cyclase, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, CaM : calmoduline, CaMK : protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante, CREB : protéine liant les éléments de réponse à l'AMPc (*cAMP response element binding protein*), DAG : diacyl glycérol, EGF : *epidermal growth factor*, EGFR : récepteur à l'EGF, *Egr1* : *early growth response gene 1*, ERK : *extracellular signal-regulated kinase*, FSH : *follicle-stimulating hormone*, *Fshβ* : sous-unité β spécifique de la FSH, GC : guanylate cyclase, GMPc : guanosine monophosphate cyclique, GnRH : *gonadotropin-releasing hormone*, Hb-EGF : *heparin-binding EGF*, IP3 : inositol 1,4,5-triphosphate, IP3R : récepteur à l'IP3, JNK : *c-Jun N-terminal kinase*, LH : *luteinizing hormone*, *Lhβ* : sous-unité β spécifique de la LH, MAPKs : *mitogen-activated protein kinases*, MMPs : métalloprotéases matricielles (*matrix metalloproteinases*), NO : monoxyde d'azote, NOS-I : NO synthase neuronale, PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PKA / PKC : protéine kinase A / C, PLCβ : phospholipase Cβ, RCPG : récepteurs couplés aux protéines G, RGnRH : récepteur de la GnRH, *αgsu* : sous-unité α des hormones glycoprotéiques

adaptée des revues de Ruf *et al.*, 2003, Naor *et al.*, 2009 et de la thèse de A.L. Schang, 2011 (tel-00633501, version 1 - 18 Oct 2011)

Les RGNRH identifiés chez les mammifères possèdent quelques particularités. La plus connue est l'absence d'une queue C-terminale intracytoplasmique, normalement requise pour la désensibilisation homologue de la plupart des RCPG (Tsutsumi *et al.*, 1992, Kakar *et al.*, 1992). Cette caractéristique structurale s'avère être une condition essentielle pour l'obtention de l'effet anti-tumoral direct des analogues de la GnRH (pour revue : Millar, 2005, voir § 3.3.1).

Le RGNRH humain ne possède qu'un seul site de glycosylation, situé dans l'extrémité N-terminale extracellulaire (Davidson *et al.*, 1995) (**Figure 46**). Par ailleurs, la séquence du RGNRH humain présente une lysine en position 191 qui entraîne sa rétention dans le RE, diminuant ainsi son adressage à la membrane plasmique (Brothers *et al.*, 2006, pour revue : Conn *et al.*, 2002).

1.2.2. Régulation transcriptionnelle du *RGNRH*

Chez l'Homme, le gène codant le RGNRH hypophysaire est localisé sur le chromosome 4 (Kaiser *et al.*, 1994, Kottler *et al.*, 1995). Il est composé de trois exons et deux introns et présente une taille d'environ 20 kb.

La GnRH est engagée dans la régulation de la transcription de nombreux gènes dans les cellules gonadotropes, parmi lesquels le gène codant le RGNRH a été identifié (Kakar *et al.*, 2003). Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* montrent que l'effet de la GnRH sur l'expression de son récepteur dépend fortement des modalités de stimulation (pour revue : Hapgood *et al.*, 2005). À titre d'exemple, des cultures primaires hypophysaires de rat stimulées de manière pulsatile par la GnRH (10 nM, 6 min/h) présentent une augmentation des ARNm codant le RGNRH. En revanche, aucun changement n'est observé suite au traitement continu des cellules avec la GnRH (Kaiser *et al.*, 1993).

À côté de la régulation homologue par la GnRH, des observations faites sur des rattes ovariectomisées et des rats castrés suggèrent également l'implication des stéroïdes sexuels dans la régulation de la transcription du *Rgnrh* hypophysaire (Kaiser *et al.*, 1993, pour revues : Hapgood *et al.*, 2005, Kottler et Richard, 2008).

1.2.3. Signalisation et désensibilisation du RGNRH

a. Voies de signalisation associées au RGNRH

Le changement conformationnel du récepteur, observé suite à la liaison de la GnRH, permet son association avec les protéines G hétérotrimériques. Cette interaction induit leur activation, notamment celle de la sous-unité $G\alpha$. Ces étapes constituent le point de départ de la cascade de signalisation, qui sera suivie par la propagation intracellulaire du signal vers les différents effecteurs (**Figure 47**).

Dans les cellules gonadotropes hypophysaires, le RGNRH interagit principalement avec la sous-unité $G\alpha_q/11$ (Hsieh et Martin, 1992, Grosse *et al.*, 2000, pour revues : Naor, 2009). Le couplage du RGNRH avec cette sous-unité conduit à l'activation de la phospholipase C bêta ($PLC\beta$) qui catalyse le clivage du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en deux seconds messagers : le diacylglycérol (DAG) et l'IP3. Le DAG va induire l'activation de différentes isoformes de la PKC et permettre la mise en place de la cascade des MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*). Cette cascade

aboutira *in fine* à la transcription de nombreux gènes et notamment ceux codant les sous-unités α et β des gonadotropines. D'un autre côté, l'IP3 libéré dans le cytoplasme va permettre la mobilisation de calcium intracellulaire à partir des stocks du RE. Il est maintenant clairement établi que l'augmentation intracytoplasmique de calcium participe à l'exocytose des gonadotropines.

Certaines études, menées dans la lignée gonadotrope murine L β T2, montrent également une augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc suite à la stimulation de ces cellules par la GnRH. Les mécanismes impliqués ont longtemps été controversés. Certains auteurs suggèrent un couplage du RGnRH avec les sous-unités G α q/11 et G α s (Liu *et al.*, 2002). D'autres proposent que l'activation de l'AC (isoformes AC5 et AC7) pourrait être provoquée, sous certaines conditions, par certaines isoformes de PKC nouvelles (nPKC δ et ϵ) initialement activées par le DAG (Lariviere *et al.*, 2007, Cohen-Tannoudji *et al.*, 2012).

Enfin, l'association du RGnRH avec la sous-unité G α i a été très peu rapportée dans les cellules gonadotropes. Cette voie est cependant particulièrement bien décrite hors de l'hypophyse, dans l'effet anti-tumoral des ligands.

b. Désensibilisation du RGnRH

Le RGnRH (type I) ne possède pas de queue C-terminale intracytoplasmique. Cette particularité, propre aux récepteurs de la GnRH mammaliens, explique très probablement leur résistance à la désensibilisation et leur internalisation très lente à la suite d'une stimulation prolongée par la GnRH. Ces caractéristiques ont été rapportées par de nombreuses études et notamment par le groupe de C.A. McArdle. Des travaux de co-transfections (β -arrestine-GFP et RGnRH) révèlent qu'à la différence du RGnRH de Xénope, très rapidement désensibilisé et internalisé suite à la stimulation par la GnRH, le RGnRH mammalien apparaît résistant à la désensibilisation. Il n'est que très lentement et faiblement internalisé, n'induisant pas la translocation de la protéine β -arrestine-GFP à la membrane plasmique (Hislop *et al.*, 2000, pour revues : McArdle *et al.*, 2002a,b).

Au vu de ces observations, il apparaît difficile d'expliquer une constatation essentielle établie par Belchetz et collaborateurs : une stimulation soutenue par la GnRH conduit à une forte diminution des sécrétions de gonadotropines (Belchetz *et al.*, 1978). Il fut proposé que la désensibilisation des cellules gonadotropes pourrait impliquer des réponses adaptatives en aval du récepteur. Ces dernières dépendraient fortement du rythme de sécrétion de la GnRH (Counis *et al.*, 2009, pour revues : McArdle *et al.*, 2002a,b).

1.3. Le système GnRH de type II

Depuis la caractérisation de la GnRH mammalienne en 1971, d'autres formes de GnRH ont été identifiées chez les vertébrés. À l'heure actuelle, trois formes de GnRH ont été isolées. Seules les GnRH de type I et II sont présentes chez l'Homme (pour revues : Kah *et al.*, 2007, Naor, 2009).

C'est en 1984 qu'une seconde forme de GnRH a été isolée à partir du cerveau de poulet : la cGnRH-II (*chicken* GnRH-II) ou GnRH-II (Miyamoto *et al.*, 1984). Cette forme de GnRH, hautement conservée, a été identifiée chez la plupart des vertébrés, dont l'espèce humaine (Chen *et al.*, 1998,

White *et al.*, 1998). Largement distribuée dans le système nerveux central (SNC), la GnRH-II est également retrouvée dans le système nerveux périphérique (SNP) et certains tissus périphériques tels que les reins, la prostate, l'ovaire ou encore l'endomètre (White *et al.*, 1998, Cheon *et al.*, 2001, Leung *et al.*, 2003). Bien qu'elle soit capable de stimuler la sécrétion des gonadotropines, son efficacité est bien moindre en comparaison de la GnRH-I (Densmore et Urbanski, 2003).

La découverte de la GnRH-II chez les mammifères a conduit à la recherche de son récepteur. Le clonage du RGnRH-II a ainsi été rapporté chez le macaque rhésus et le marmouset (Neill *et al.*, 2001, Millar *et al.*, 2001). À noter que le RGnRH-II est fonctionnellement et structuellement différent du RGnRH-I : tous les RGnRH-II identifiés à ce jour présentent une queue C-terminale intracytoplasmique (pour revue : Kakar *et al.*, 2004).

Il semble aujourd'hui admis que seul le RGnRH-I soit présent chez l'Homme. Bien que des observations suggèrent que le gène codant le RGnRH-II soit transcriptionnellement actif, la présence d'un codon stop prématuré dans l'exon 2 rend impossible la synthèse d'un récepteur fonctionnel (pour revue : Cheung et Wong, 2008).

2. Présence du RGnRH hors de l'hypophyse

De nombreux sites d'expression extra-hypophysaires ont été décrits chez l'Homme pour le RGnRH. Ces derniers sont récapitulés dans les **Tableaux VIII** et **IX**. Le RGnRH est retrouvé, assez logiquement, dans le tractus génital (mâle et femelle), mais également dans de nombreux tissus périphériques non reproducteurs normaux (**Tableau VIII**). De façon intéressante, sa présence est également rapportée dans de multiples tissus tumoraux, liés ou non au système reproducteur (**Tableau IX**). L'identification du couple GnRH/RGnRH dans la majorité de ces sites extra-hypophysaires suscite de nombreuses interrogations, comme celle de son/ses rôle(s) physiologique(s) en dehors de l'hypophyse (pour revues : Hapgood *et al.*, 2005, Aguilar-Rojas et Huerta-Reyes, 2009).

L'étude au niveau protéique du RGnRH reste relativement discutée. Cela s'explique par la faible spécificité des anticorps commerciaux. Des techniques telles que le Western blot et l'immunomarquage restent cependant couramment utilisées, comme en témoignent plusieurs travaux publiés récemment (Quintanar *et al.*, 2009, Sundaram *et al.*, 2009a, Anjum *et al.*, 2012). Le développement de modèles animaux transgéniques, tels que le modèle souris Gnhrh-hPLAP (*human placental alkaline phosphatase*) par l'équipe de J.N. Laverrière, a permis de confirmer et de préciser des sites précédemment décrits (Granger *et al.*, 2004). Ce modèle a également conduit à l'identification de nouveaux sites d'expression : la glande pinéale et la rétine (Schang *et al.*, 2012).

Le RGnRH est également présent dans le système respiratoire. Toutefois, cela reste à l'heure actuelle relativement peu décrit, notamment en ce qui concerne le tissu normal humain. Une étude a mis en évidence l'expression du RGnRH par RT-PCR [*reverse transcription PCR (polymerase chain reaction)*] et Western blot dans la lignée cellulaire humaine Calu-3 (Koushik *et al.*, 2004).

Tableau VIII : Résumé des différents sites d'expression extra-hypophysaires décrits chez l'Homme pour le RGNRH (tissus normaux) (1/2)

	Tissus normaux		RGNRH		GnRH	rôle du système GnRH		Références	
	Cultures primaires		ARNm	protéine	(locale)	(mode d'action paracrine/autocrine)	détection	rôle physiologique	
Tissus liés au système reproducteur	Ovaires								
	cellules de la granulosa cellules lutéales épithélium de surface	[2]	[4, 5, 6, 7]	OUI		◦ inhibition de la stéroïdogénèse ◦ régulation de l'expression des ER- α et ER- β	Tureck <i>et al.</i> , 1982 Bramley <i>et al.</i> , 1987 Latouche <i>et al.</i> , 1989 Peng <i>et al.</i> , 1994 Kang <i>et al.</i> , 2000 Kang <i>et al.</i> , 2001a,b Choi <i>et al.</i> , 2006	Pellicer <i>et al.</i> , 1990 Guerrero <i>et al.</i> , 1993 Gaetje, 1994) Chiang <i>et al.</i> , 2000 Kang <i>et al.</i> , 2001c	
	Placenta								
	trophoblastes cytotrophoblastes syncytiotrophoblastes	[1, 2]	[4, 5]	OUI		◦ stimulation de la synthèse et de la sécrétion de l'hCG ◦ régulation de l'expression des MMPs et des TIMPs (remodelage tissulaire lors des stades précoces de l'implantation, maintien de la grossesse)	Currie <i>et al.</i> , 1981 Belisle <i>et al.</i> , 1984 Iwashita <i>et al.</i> , 1986 Lin <i>et al.</i> , 1995 Kakar et Jennes, 1995 Boyle <i>et al.</i> , 1998 Wolfahrt <i>et al.</i> , 1998 Cheng <i>et al.</i> , 2000	Belisle <i>et al.</i> , 1984 Lin <i>et al.</i> , 1995 Chou <i>et al.</i> , 2003a	
	Endomètre								
	Myomètre	[2]	[4, 5]	OUI		◦ modulation de la sécrétion de l'hCG placentaire ◦ régulation de l'expression des MMPs et des TIMPs (remodelage tissulaire lors des stades précoces de l'implantation, maintien de la grossesse)	Imai <i>et al.</i> , 1994 Chagini <i>et al.</i> , 1996 Raga <i>et al.</i> , 1998 Borroni <i>et al.</i> , 2000	Raga <i>et al.</i> , 1998 Raga <i>et al.</i> , 1999 Chou <i>et al.</i> , 2003b	
	Glande mammaire	[2, 3]			OUI	non renseigné	Kakar <i>et al.</i> , 1992 Baram <i>et al.</i> , 1977		
	Testicules								
	spermatozoïdes	[2, 3]	[7]	OUI		◦ amélioration de la motilité des spermatozoïdes ◦ amélioration de l'interaction entre les spermatozoïdes et la zone pellucide	Kakar <i>et al.</i> , 1992 Lee <i>et al.</i> , 2000 Morales et Lianos, 1996	Morales, 1998	
	Prostate	[2, 3]			OUI	non renseigné	Kakar <i>et al.</i> , 1992 Morales et Lianos, 1996		

Tableau VIII : Résumé des différents sites d'expression extra-hypophysaires décrits chez l'Homme pour le RGnRH (tissus normaux) (2/2)

	Tissus normaux Cultures primaires	RGnRH		GnRH	rôle du système GnRH	Références	
		ARNm	protéine	(locale)	(mode d'action paracrine/autocrine)	détection	rôle physiologique
Tissus non liés au système reproducteur	Système immunitaire				<u>cellules mononucléaires</u> : stimulation de la production d'IFN- γ		
	cellules immunitaires circulantes (cellules mononucléaires, lymphocytes T)	[2]	[5]	OUI	<u>lymphocytes T</u> : stimulation de la transcription du gène codant un récepteur de la laminine (67 kDa-LR) (promotion de l'adhésion et de la migration cellulaire)	Chen <i>et al.</i> , 1999 Chen <i>et al.</i> , 2002	Grasso <i>et al.</i> , 1998 Chen <i>et al.</i> , 2002
	SNC						
	hippocampe (neurones pyramidaux) cortex (neurones corticaux)		[7] [7]	non renseigné	non renseigné ◦ régulation de l'expression de la LH β	Wilson <i>et al.</i> , 2006 Wilson <i>et al.</i> , 2006	
	Autres tissus						
	foie, rein, cœur, muscle squelettique	[2]	[4] (rein)	OUI	non renseigné	Sion-Vardi <i>et al.</i> , 1992 Kakar et Jennes, 1995	

→ méthodes de détection :

[1] = hybridation *in-situ*, [2] = RT-PCR, [3] = Northern blot, [4] = liaison de GnRH marquée à l'iode 125 (^{125}I -GnRH), [5] = effets biologiques induits par GnRH

[6] = Western blot, [7] = immunocytochimie ou immunocytochimie

ER- α/β : récepteur aux œstrogènes (alpha et bêta), GnRH : *gonadotropin-releasing hormone*, hCG : hormone chorionique gonadotrope, IFN- γ : interféron gamma, kDa : kilodalton

LH β : sous-unité β de la LH (*luteinizing hormone*), LR : récepteur de la laminine (*laminin receptor*), MMPs : métalloprotéases matricielles (*matrix metalloproteinases*)

RGnRH : récepteur de la GnRH, RT-PCR : *reverse transcription PCR* (*polymerase chain reaction*), SNC : système nerveux central

TIMPs : inhibiteurs tissu spécifique des MMPs (*tissue-specific inhibitor of MMPs*)

Remarque : il s'agit ici d'une liste d'études non exhaustive. Seules apparaissent les études initiales rapportant la présence du RGnRH et le rôle joué par le système GnRH local.

adapté de Hapgood et al., 2005

Tableau IX : Résumé des différents sites d'expression extra-hypophysaires décrits chez l'Homme pour le RGnRH (tissus tumoraux)

	Tissus tumoraux (et lignées cellulaires dérivées de tumeurs)	RGnRH		Références
		ARNm	protéine	
Tissus liés au système reproducteur	Ovaires	[1]	[3]	Kakar <i>et al.</i> , 1994 Emons <i>et al.</i> , 1998
	Endomètre	[1]	[2, 3]	Emons <i>et al.</i> , 1993 Chatzaki <i>et al.</i> , 1996
	Utérus (léiomyosarcome)	[1]	[2]	Imai <i>et al.</i> , 1996
	Sein	[1]	[2]	Eidne <i>et al.</i> , 1985 Kakar <i>et al.</i> , 1994
	Placenta (lignée JEG-3 : choriocarcinome)	[1]	[3]	Chatzaki <i>et al.</i> , 1996 Cheng <i>et al.</i> , 2000 Zhang <i>et al.</i> , 2003
	Prostate (lignée DU 145 : carcinome)	[1]	[2]	Kakar <i>et al.</i> , 1994 Dondi <i>et al.</i> , 1994
Tissus non liés au système reproducteur	Foie (lignée HepG2 : hépatocarcinome)	[1]	[3]	Pati et Habibi, 1995 Yin <i>et al.</i> , 1998
	Pancréas		[2]	Fekete <i>et al.</i> , 1989 Schally <i>et al.</i> , 1990
	Côlon (lignées HT29, HCT-116, HCT-15, LoVo, Colo-320DM : carcinome)	[1]	[2]	Szepeshazi <i>et al.</i> , 2007
	Peau (lignées BLM et Me15392 : mélanome)	[1]	[2, 3, 4]	Moretti <i>et al.</i> , 2002 Moretti <i>et al.</i> , 2003
	Rein (tissus + lignées A-498, ACHN, 786-0 : carcinome)	[1]	[2, 4, 5]	Sion-Vardi <i>et al.</i> , 1992 Jungwirth <i>et al.</i> , 1998 Keller <i>et al.</i> , 2005b
	Larynx (lignée Hep-2)		[2]	Krebs <i>et al.</i> , 2002
	Cerveau (tissus + lignées U87MG, U373 : glioblastome)	[1]	[4]	Montagnani Marelli <i>et al.</i> , 2009
	Système immunitaire (lymphome et leucémie)	[1]	[2, 3, 4, 5]	Chen <i>et al.</i> , 2002 Keller <i>et al.</i> , 2005a

→ méthodes de détection :

[1] = RT-PCR, [2] = liaison de GnRH marquée à l'iode 125 (125I-GnRH), [3] = effets biologiques induits par GnRH

[4] = Western blot, [5] = immunocytochimie ou immunocytochimie

GnRH : gonadotropin-releasing hormone , RGnRH : récepteur de la GnRH

RT-PCR : reverse transcription PCR (polymerase chain reaction)

Remarque : il s'agit ici d'une liste d'études non exhaustive. En plus des tissus tumoraux, le RGnRH a été décrit dans de très nombreuses lignées cellulaires dérivées de ces tumeurs (ovaire, endomètre, sein et prostate).

Une prédominance du RGnRH au niveau du pôle apical et des faces latérales de ces cellules a été rapportée suite à des observations en microscopie confocale. La présence du RGnRH dans différents tissus respiratoires normaux bovins (tissu nasal) et de rat (tissu pulmonaire, trachée) a aussi été démontrée (Koushik *et al.*, 2004, Koushik et Kompella, 2004). L'expression du RGnRH dans le cornet moyen et le cornet inférieur de bovin a été précisée plus récemment (Sundaram *et al.*, 2009a). Selon les auteurs, le RGnRH pourrait être impliqué dans le transport vectoriel d'agonistes de la GnRH à travers l'épithélium respiratoire (Koushik et Kompella, 2004, Sundaram *et al.*, 2009a). Par ailleurs, la présence du récepteur dans des lignées établies de carcinomes pulmonaires humains (A549 et H1299) a également été décrite (Sundaram *et al.*, 2009b, Taratula *et al.*, 2011).

Aucune étude n'a encore été menée à ce jour sur la production locale de GnRH dans les voies aériennes. Au vu de certaines de leurs propriétés, les cellules neuroendocrines pulmonaires (PNECs, *pulmonary neuroendocrine cells*) s'avèreraient être une piste intéressante. En effet, ces dernières sécrètent différents peptides et amines comme la calcitonine, le CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), la chromogranine A, la GRP (*gastrin-releasing peptide*), la sérotonine et la cholecystokinine (Stahlman et Gray, 1984, Polak *et al.*, 1993). Ces molécules bioactives sont impliquées dans la croissance et le développement pulmonaire et jouent donc un rôle important pendant la morphogenèse des poumons (Sunday *et al.*, 1990). Les PNECs sont présentes tout le long de l'épithélium des voies aériennes. Elles sont retrouvées isolées ou regroupées sous forme d'îlots innervés, nommés corps neuro-épithéliaux (NEBs, *neuroepithelial bodies*), lesquels sont particulièrement observés au niveau des zones de bifurcation de l'épithélium bronchiolaire (Lauweryns et Van Ranst, 1988, Linnoila, 2006).

3. L'utilisation de la GnRH en thérapeutique humaine

Rapidement après l'identification de la GnRH, le groupe de E. Knobil rapporte l'importance de sa fréquence d'administration sur la réponse hypophysaire (Belchetz *et al.*, 1978). Ces observations essentielles ont eu un impact considérable en clinique humaine et en médecine vétérinaire.

Cela fait maintenant plus de 25 ans que des analogues de la GnRH sont utilisés en thérapeutique humaine. D'un côté, des thérapies mimant la sécrétion pulsatile de GnRH sont employées pour restaurer la fertilité. De l'autre, une administration massive et répétée d'agonistes de la GnRH est utilisée pour supprimer l'activité pathologique de l'axe HHG.

3.1. Le développement des analogues de la GnRH

La demi-vie de la GnRH endogène est très courte, de l'ordre de cinq minutes chez l'Homme. Son catabolisme rapide a principalement lieu dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (pour revue : Handelsman et Swerdloff, 1986). Ceci explique pourquoi la molécule endogène est quasiment indétectable dans la circulation générale.

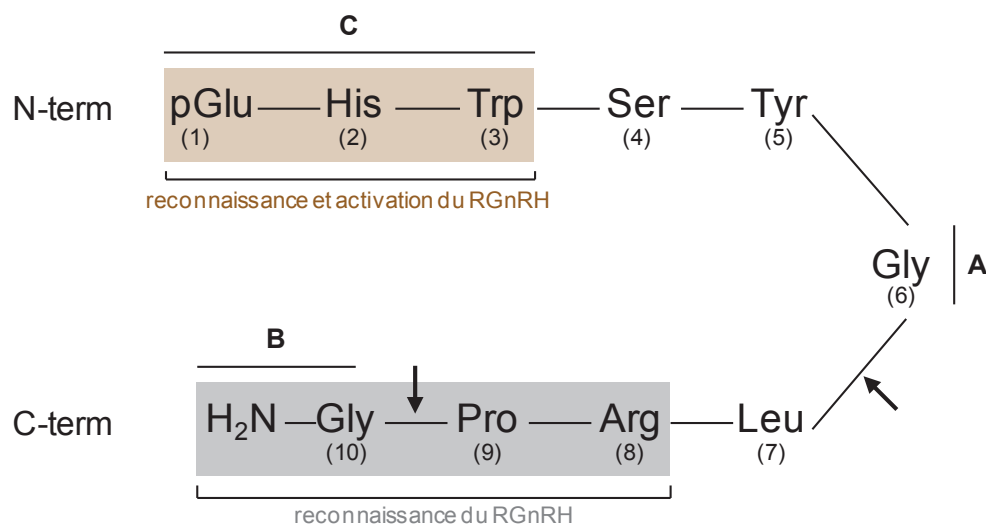


Figure 48 : De la molécule naturelle aux analogues de la GnRH

Les sites de clivages préférentiels pour les endopeptidases sont indiqués par les flèches noires (pour revues : Handelsman et Swerdloff, 1986, Karten et River, 1986). Ils sont retrouvés entre la glycine en position 6 et la leucine en position 7, mais également entre la proline en position 9 et la glycine en position 10. De multiples modifications de la GnRH native (en A, B et C) ont conduit aux puissants agonistes et antagonistes actuellement utilisés en clinique (**Tableau X**).

GnRH : gonadotropin-releasing hormone, RGnRH : récepteur de la GnRH

adaptée de la revue de Millar et al., 2004 et de Derman et al., 2004 (<http://www.glowm.com>, Volume 5, Chapitre 8)

Tableau X : Séquence en acides aminés des principaux agonistes et antagonistes de la GnRH utilisés en thérapeutique humaine

GnRH	pGlu (1)	His (2)	Trp (3)	Ser (4)	Tyr (5)	Gly (6)	Leu (7)	Arg (8)	Pro (9)	Gly-NH ₂ (10)
Agonistes										
Leuproréline	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Leu	Leu	Arg	Pro-N-Et	
Goséreliné	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Ser(tBu)	Leu	Arg	Pro	AzGly-NH ₂
Buséreliné	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Ser(tBu)	Leu	Arg	Pro-N-Et	
Nafaréline	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Nal (2)	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Triptoréline	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Trp	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
Antagonistes										
Cétorélix	Ac-(D-Nal)	D-Cpa	D-Pal	Ser	Tyr	D-Cit	Leu	Arg	Pro	D-Ala-NH ₂
Ganirelix	Ac-(D-Nal)	D-Cpa	D-Pal	Ser	Tyr	D-hArg(Et ₂)	Leu	hArg(Et ₂)	Pro	D-Ala-NH ₂
Dégarelix	Ac-(D-Nal)	D-Cpa	D-Pal	Ser	Aph(Hor)	D-Aph(Cbm)	Leu	Lys(iPr)	Pro	D-Ala-NH ₂

GnRH : gonadotropin-releasing hormone

adapté des revues de Coccia et al., 2004 et de Limonta et al., 2012

Dans l'optique de son application thérapeutique, des analogues de la GnRH ont été synthétisés afin de pallier, entre autres, son temps de demi-vie extrêmement limité. Ces analogues sont divisés en deux groupes : les agonistes et les antagonistes.

Diverses modifications de la molécule naturelle ont ainsi permis d'améliorer son affinité avec le RGNRH et de retarder sa dégradation enzymatique (**Figure 48**). Le remplacement de la glycine en position 6 (A) par un acide aminé dextrogyre et la modification, voire la suppression, du 9^{ème} et du 10^{ème} acide aminé (B) ont conduit aux principaux agonistes de la GnRH (**Tableau X**). Le remplacement de la glycine en position 6, la substitution des acides aminés en position 1, 2 et 3 (C) et la modification du 8^{ème} et du 10^{ème} résidu ont amené aux principaux antagonistes commercialisés à ce jour (**Tableau X**).

3.2. Les principaux effets secondaires rencontrés

Les agonistes et les antagonistes de troisième et quatrième génération (Cétrorélix, Ganirélix) sont réputés pour être des molécules sûres et relativement bien tolérées (pour revue : Wilson *et al.*, 2007). Quelques effets indésirables sont cependant rapportés. Cela concerne principalement les traitements longue durée. L'effet « *flare up* », observé au début de la mise en place d'une administration continue d'agonistes, peut entraîner une exacerbation de la condition pathologique suite à l'élévation initiale des gonadotropines et des stéroïdes sexuels. L'inhibition de la synthèse des hormones sexuelles, consécutive à la suppression de l'activité de l'axe HHG, entraîne des symptômes comparables à ceux de la ménopause et de l'andropause. Enfin, la déperdition osseuse prévisible est la conséquence la plus préoccupante de ce type de traitement (pour revue : Wilson *et al.*, 2007).

L'action des analogues de la GnRH est réversible. En effet, la reprise d'une activité hypothalamo-hypophysaire et ovarienne ainsi que le recouvrement de la densité minérale osseuse sont observés chez les patients après l'interruption du traitement.

3.3. Applications thérapeutiques des analogues de la GnRH

Outre leur utilisation pour restaurer la fertilité, les analogues de la GnRH sont des molécules de choix pour le traitement des cancers hormono-dépendants et autres troubles endocriniens. De plus, la présence du RGNRH dans de nombreux tissus extra-hypophysaires non liés au système reproducteur en fait des candidats potentiels pour lutter contre certaines pathologies non hormono-dépendantes.

3.3.1. Pathologies hormono-dépendantes

a. via une action indirecte des analogues

L'effet inhibiteur des analogues de la GnRH sur la fonction gonadique est à l'origine de l'action anti-tumorale indirecte utilisée pour traiter divers troubles endocriniens, comme la puberté précoce d'origine centrale (Boepple *et al.*, 1990, Lahlou *et al.*, 2000), l'endométriose (Cedars *et al.*, 1990) ou encore la polykystose ovarienne (Steingold *et al.*, 1987, Setji et Brown, 2007). La suppression de la sécrétion des stéroïdes sexuels est également recherchée pour lutter contre des cancers hormono-dépendants tels que les cancers du sein, de la prostate et autres cancers gynécologiques

(ovaire, endomètre, léiomyomes utérins) (Falcone *et al.*, 1982, Furr et Nicholson, 1982, pour revue : Emons et Schally, 1994).

b. via une action directe des analogues

Le RGnRH est exprimé dans de nombreux tissus tumoraux (et lignées cellulaires dérivées de tumeurs) liés au système reproducteur : cancer de l'ovaire (Kakar *et al.*, 1994, Emons *et al.*, 1998), cancer de l'endomètre (Emons *et al.*, 1993, Chatzaki *et al.*, 1996), léiomyosarcome utérin (Imai *et al.*, 1996), cancer du sein (Eidne *et al.*, 1985, Kakar *et al.*, 1994), choriocarcinome (Chatzaki *et al.*, 1996, Cheng *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2003), et cancer de la prostate (Kakar *et al.*, 1994, Dondi *et al.*, 1994). Ces observations combinées à de nombreux travaux rendent compte d'une possible implication directe des analogues de la GnRH en pathologie cancéreuse. Leur effet cytotoxique direct viendrait renforcer l'action hormonale observée en amont.

L'absence de queue C-terminale intracytoplasmique dans la structure du RGnRH est un prérequis essentiel pour l'obtention de cette action anti-tumorale des analogues. Sa résistance à la désensibilisation semble associée à un signal intracellulaire prolongé nécessaire à la mise en place des effets anti-tumoraux (pour revue : Millar, 2005). Il est maintenant bien accepté que les RGnRH extra-hypophysaires présentent une séquence nucléotidique en ADNc qui code un ARNm et une protéine de même taille que le récepteur hypophysaire (Kakar *et al.*, 1994, Limonta *et al.*, 1999).

3.3.2. Pathologies hormono-indépendantes

Des sites de liaison spécifiques pour la GnRH ont également été rapportés dans plusieurs tissus tumoraux (et lignées cellulaires qui en dérivent) non liés au système reproducteur (**Tableau IX**) : hépatocarcinome (Pati et Habibi, 1995, Yin *et al.*, 1998), cancer du larynx (Krebs *et al.*, 2002), cancer du pancréas (Fekete *et al.*, 1989, Schally *et al.*, 1990), cancer colorectal (Szepeshazi *et al.*, 2007), lymphome et leucémie (Keller *et al.*, 2005a, Chen *et al.*, 2002), cancer du rein (Sion-Vardi *et al.*, 1992, Keller *et al.*, 2005b, Jungwirth *et al.*, 1998), mélanome (Moretti *et al.*, 2002, Moretti *et al.*, 2003), glioblastome (Montagnani Marelli *et al.*, 2009) et cancer du poumon (Sudaram *et al.*, 2009b, Taratula *et al.*, 2011).

La liaison de certains analogues sur les RGnRH présents sur ces tissus cibles conduit à une puissante action anti-tumorale. De tels effets restent cependant beaucoup moins décrits que pour les tumeurs hormono-dépendantes. Le manque d'essais cliniques incite à une certaine prudence dans l'extrapolation des différentes données *in vitro* et *in vivo* (pour revue : Limonta *et al.*, 2012).

L'utilisation d'agonistes de la GnRH s'avérerait également être une piste thérapeutique potentielle pour le traitement de maladies neurologiques telles que la sclérose en plaques. Une expression du RGnRH est observée dans la moelle épinière de mouton (Dolan *et al.*, 2003) et de rat (Quintanar *et al.*, 2009). Par ailleurs, la stimulation de neurones corticaux de rat (en culture) par la GnRH augmente la croissance neuritique, laissant suggérer des propriétés neurotrophiques pour la GnRH, via une action directe médiée par les RGnRH (Quintanar et Salinas, 2008). Plus récemment,

des travaux menés sur des ratte ovariectionisées atteintes d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) montrent que l'administration de Leuproréline atténue la sévérité de la maladie (Quintanar *et al.*, 2010, Guzman-Soto *et al.*, 2012).

Enfin, une étude plus ancienne rapporte qu'un traitement avec ce même agoniste a conduit à une amélioration significative de la condition pathologique de patients souffrant du syndrome de l'intestin irritable (Mathias *et al.*, 1989).

3.3.3. Activité anti-tumorale des ligands

L'effet anti-tumoral des analogues de la GnRH s'exerce à trois niveaux : i) la croissance cellulaire (effet anti-prolifératif et/ou pro-apoptotique), ii) la capacité migratoire et invasive des cellules et iii) l'angiogenèse. Cela est particulièrement bien décrit dans les lignées cellulaires dérivées de tumeurs hormono-dépendantes (pour revue : Limonta *et al.*, 2012).

La dichotomie observée entre agonistes et antagonistes dans les cellules gonadotropes n'existe pas dans les cellules cancéreuses. Comme les agonistes, les antagonistes exercent dans ces dernières une puissante action anti-tumorale (Emons *et al.*, 1997). Par ailleurs, alors que le RGnRH hypophysaire est principalement couplé à la sous-unité $G_{\alpha q/11}$, le RGnRH exprimé dans les tissus tumoraux serait exclusivement associé à la sous-unité $G_{\alpha i}$ (Imai *et al.*, 1996, Emons *et al.*, 1998, Limonta *et al.*, 1999, Gründker *et al.*, 2001).

Ce couplage entrainerait ou interférerait négativement avec l'activation de différentes cascades de signalisation telles que les voies MAPKs [ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK1-3 (*c-Jun N-terminal kinase*), p38, ERK5] et PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase). Un dialogue avec les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) a également été rapporté (pour revues : Limonta *et al.*, 2012, Naor et Huhtaniemi, 2012).

3.3.4. Conclusion

Les divers effets biologiques et propriétés pharmacologiques des agonistes et antagonistes dans des environnements cellulaires différents soulèvent de nombreuses interrogations. Comment expliquer d'un côté, le couplage du RGnRH à la protéine $G_{\alpha q/11}$ (à l'origine de la synthèse et de la sécrétion des gonadotropines) au niveau de l'antéhypophyse et de l'autre, celui à la protéine $G_{\alpha i}$ (associé à ce puissant effet anti-tumoral) dans les cellules cancéreuses ? Une explication possible a été proposée par le groupe de R. Millar : la théorie de la « signalisation sélective induite par le ligand » (Millar et Pawson, 2004, pour revue : Millar *et al.*, 2008). Selon ce concept, le RGnRH pourrait adopter différentes conformations de façon dépendante du contexte cellulaire. Un ligand spécifique (ex : L_1 , agoniste ou antagoniste) lierait sélectivement et stabiliserait le RGnRH dans une certaine conformation active (R_1), laquelle conduirait à l'activation d'un complexe de signalisation (SC_1) et d'une réponse cellulaire spécifique (synthèse et sécrétion des gonadotropines). L'équipement cellulaire est également à prendre en considération. Selon les auteurs, ce dernier (ex : SC_1) induirait

la stabilisation d'une certaine conformation active du récepteur (R_1) et, de ce fait, favoriserait la liaison du ligand L_1 .

Enfin, l'impact bi-phasique des analogues sur la fonction cellulaire dans les tumeurs est aujourd'hui clairement reconnu. En fonction de la concentration utilisée, des effets différents, voire totalement opposés, peuvent être observés. A titre d'exemple, un effet anti-prolifératif sur la lignée cellulaire ES-2 (dérivée d'un carcinome de l'ovaire humain) est rapporté pour de fortes concentrations en agoniste ($1\ \mu\text{M}$). Les mêmes cellules traitées avec des concentrations plus faibles d'analogue ($10\ \text{nM}$) montrent, quant à elles, une stimulation significative de leur croissance (Arencibia et Schally, 2000).

CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Partie 1. Contexte de l'étude

L'identification de nouveaux partenaires (directs ou indirects) de la protéine CFTR représente un axe important de la recherche sur la mucoviscidose, pouvant conduire à la mise en évidence de cibles thérapeutiques potentielles.

1. Découverte de l'interaction CFTR-AnxA5 et répercussion sur le transport ionique médié par le canal CFTR

C'est dans ce contexte qu'une interaction directe entre le canal ionique et la protéine AnxA5 a été mise en évidence au sein de notre laboratoire (**Tableau VII**). La présence du CFTR et de l'AnxA5 dans un même complexe protéique a été montré *in vitro* par la technique de co-IP, utilisant des lysats protéiques issus de cellules A549 transfectées de manière stable afin d'exprimer le CFTR (wt ou F508del) et de tissu nasal humain. Des expérimentations d'overlay et de SPR conduites sur des protéines (ou peptides) purifiées [CFTR entier ou NBD1 (wt et F508del)] ont permis de s'assurer du caractère direct de ce lien physique. Plusieurs observations ont été faites au cours de ces travaux : i) l'interaction CFTR-AnxA5 est Ca^{2+} et ATP-dépendante, ii) l'AnxA5 interagit avec NBD1 et iii) la mutation F508del ne perturbe pas l'interaction (SPR). Soulevant la pertinence physiologique de cette découverte, une codistribution partielle entre le canal CFTR et l'AnxA5 a également été observée dans le compartiment apical de cellules épithéliales bronchiques humaines (coupes tissulaires). Par ailleurs, la mise en œuvre de la microcytofluorométrie dynamique, utilisant la molécule SPQ [6-methoxy-N-(3-sulfopropyl) quinolinium], a démontré que le flux d'halogénures (I^-) à travers le canal CFTR (stimulés par un cocktail IBMX/Fsk) était dépendant du niveau d'expression intracellulaire d'AnxA5. Ainsi, des cellules A549 exprimant le CFTR-wt transfectées avec un siRNA dirigé contre l'AnxA5, présentent une baisse de la sécrétion des ions I^- , laquelle corrèle avec une diminution de la présence du CFTR dans la membrane plasmique. Des observations opposées sont rapportées lorsque ces mêmes cellules sont transfectées avec un plasmide permettant d'augmenter la quantité intracellulaire d'AnxA5 (pcDNA3.1/AnxA5). À l'issue de ces travaux, l'AnxA5 a été proposée comme cible thérapeutique potentielle. En favorisant la présence du CFTR à la surface cellulaire, l'AnxA5 serait impliquée dans les sécrétions ioniques médiées par le canal (Trouvé *et al.*, 2007).

Forts de ces observations et ayant démontré que la mutation la plus couramment rencontrée chez les patients n'altérerait pas l'interaction CFTR-AnxA5, ces travaux se sont poursuivis par l'étude des effets engendrés par la modulation de l'expression de l'AnxA5 dans les cellules exprimant le mutant F508del de la protéine CFTR (Le Drévo *et al.*, 2008).

Cette étude a initialement été menée sur le modèle cellulaire A549 transfecté, exprimant de façon stable le CFTR-F508del. Occupant un poste d'ingénieur d'études au sein de l'unité, la suite des travaux m'a été confiée. Ces derniers ont été complétés par l'utilisation d'un autre modèle, présentant de préférence une expression endogène de la protéine CFTR. Une partie des expérimentations a ainsi été reconduite avec la lignée cellulaire CFBE41o-, homozygote pour la mutation F508del.

Bien que ce travail ait fait l'objet d'un article publié dans le journal *Biochimica et Biophysica Acta* (*Molecular Basis of Disease*) en août 2008, c'est à dire avant mon inscription en doctorat, il a été choisi de l'incorporer au contexte de l'étude.

2. Article 1 : Conséquences de la modulation de l'expression de l'AnxA5 dans des cellules exprimant le CFTR-F508del

2.1. Modèles d'étude : lignée A549 exprimant le CFTR-F508del (transfection stable)

Dans un premier temps, la technique de co-IP a permis de vérifier que l'AnxA5 co-immunoprécipitait avec le CFTR dans des cellules exprimant la version mutée du canal, sous-entendant que le CFTR-F508del et l'AnxA5 sont bien présents dans un même complexe protéique. Par la suite, utilisant les stratégies de shRNA (*short hairpin RNA*) et de surexpression (pcDNA3.1/AnxA5), il fut observé que le flux d'I⁻ AMPc-dépendant était corrélé au niveau d'expression intracellulaire d'AnxA5. Ces observations ont pu être confirmées par patch-clamp. Ainsi, la surexpression de l'AnxA5 dans les cellules exprimant le CFTR-F508del conduit à une hausse des courants médiés par le canal CFTR (stimulés par un cocktail IBMX/Fsk), laquelle s'expliquerait par une augmentation de la quantité de canaux dans la membrane plasmique. Celle-ci a été démontrée par la technique de biotinylation des protéines membranaires, permettant d'évaluer l'expression du CFTR à la surface cellulaire.

Par ailleurs, ces travaux ont également montré que la surexpression de l'AnxA5 dans ces mêmes cellules potentialisait l'effet de la Tg seule. Ces deux conditions réunies conduisent à une élévation des pentes des droites I-V (conductance) lors des expérimentations de patch-clamp, comparativement à la surexpression de l'AnxA5 ou au traitement avec la Tg seul. Il fut proposé que l'effet positif de la Tg impliquait l'AnxA5. L'augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca²⁺ permettrait la relocalisation de l'annexine à la membrane plasmique (Le Drévo *et al.*, 2008).

2.2. Modèle d'étude : lignée CFBE41o- exprimant le CFTR-F508del (expression endogène)

Après avoir vérifié l'expression basale de l'AnxA5 dans le modèle CFBE41o-, nous nous sommes assurés que ce dernier répondait bien aux transfections avec les différents plasmides permettant de moduler l'expression intracellulaire de l'AnxA5 [pENTR/U6/AnxA5 (codant un shRNA dirigé contre l'AnxA5) et pcDNA3.1/AnxA5]. Bien que ces transfections n'aient pas été effectuées en parallèle avec les cellules A549, la transfection avec le pENTR/U6/AnxA5 semble moins efficace dans les cellules CFBE41o-. La diminution de l'expression de l'AnxA5 48 heures après la transfection y est relativement plus faible (~ 75 % pour la lignée A549-F508del contre ~ 50 % pour la lignée CFBE41o-). De façon similaire aux cellules A549 exprimant le CFTR-F508del, une augmentation de la sécrétion des ions I⁻ AMPc-dépendante a été observée suite à la surexpression de l'AnxA5 dans les cellules CFBE41o-. L'utilisation de la technique de biotinylation ainsi que la réalisation d'immunomarquages ont permis de corrélérer ces observations avec une augmentation de l'expression membranaire du CFTR-F508del (Le Drévo *et al.*, 2008).



Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the $\Delta F508$ -cystic fibrosis transmembrane regulator

Marie-Anne Le Drévo^{a,b,c}, Nathalie Benz^{a,b,c}, Mathieu Kerbirou^{a,b,c}, Marie-Agnès Giroux-Metges^d, Jean-Pierre Pennec^d, Pascal Trouvé^{a,b,c,*}, Claude Férec^{a,b,c,e,*}

^a Inserm, U613, Brest, F-29200, France

^b Univ Brest, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, UMR-S613, Brest, F-29200, France

^c Etablissement Français du Sang (EFS) Bretagne, Brest, F-29200, France

^d Univ Brest, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, laboratoire de physiologie, CS 93837, Brest, F-29200, France

^e CHU Brest, Hop. Morvan, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Brest, F-29200, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2007

Received in revised form 1 August 2008

Accepted 4 August 2008

Available online 15 August 2008

Keywords:

Cystic fibrosis

Annexin A5

CFTR

Protein interaction

CFTR function

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is caused by a mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. In CF, the most common mutant $\Delta F508$ -CFTR is misfolded, is retained in the ER and is rapidly degraded. If conditions could allow $\Delta F508$ -CFTR to reach and to stabilize in the plasma membrane, it could partially correct the CF defect. We have previously shown that annexin V (anxA5) binds to both the normal CFTR and the $\Delta F508$ -CFTR in a Ca^{2+} -dependent manner and that it regulates the chloride channel function of Wt-CFTR through its membrane integration. Our aim was to extend this finding to the $\Delta F508$ -CFTR. Because some studies show that thapsigargin (Tg) increases the $\Delta F508$ -CFTR apical expression and induces an increased $[Ca^{2+}]_i$ and because anxA5 relocates and binds to the plasma membrane in the presence of Ca^{2+} , we hypothesized that the Tg effect upon $\Delta F508$ -CFTR function could involve anxA5. Our results show that raised anxA5 expression induces an augmented function of $\Delta F508$ -CFTR due to its increased membrane localization. Furthermore, we show that the Tg effect involves anxA5. Therefore, we suggest that anxA5 is a potential therapeutic target in CF.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common severe autosomal recessive genetic disorder in Caucasians. It is due to a mutation in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) [1–3]. The CFTR protein is a cAMP-regulated chloride (Cl^-) channel localized at the apical surface of epithelial cells. It is composed of two transmembrane segments, two nucleotide-binding domains (NBDs) and a regulatory domain (R domain) [1]. The R domain harbours multiple consensus phosphorylation sites by the protein kinase A (PKA) and the protein kinase C (PKC) [4]. The phosphorylation of the R domain together with the ATP binding and hydrolysis at the NBDs regulate the gating of the CFTR channel [4].

CF is caused by a defective Cl^- transport in the plasma membrane of epithelial cells in the lung, pancreas, liver, intestines, sweat duct and the epididymis [5]. Nevertheless, mutations in the CF gene lead to a variety of clinical defects, showing that the link between genotype and phenotype is complex [1,6]. The most common mutation in CFTR

leading to CF is a three-base-pair deletion which results in the absence of a phenylalanine residue at amino acid position 508 ($\Delta F508$) in NBD1 [7]. The $\Delta F508$ -CFTR protein is misfolded [8], retained in the endoplasmic reticulum (ER) through interactions with the chaperones and targeted to degradation via the proteasome [7,9]. Indeed, the misfolded $\Delta F508$ -CFTR interacts with the ER chaperones [10,11] which exhibit an optimal activity when free calcium (Ca^{2+}) concentration is millimolar. Nevertheless, if some $\Delta F508$ -CFTR protein reaches the cell surface, it exhibits a normal Cl^- channel function despite a shorter half-life than the normal CFTR [11,13]. Therefore, studies were performed to restore the membrane localization and function of $\Delta F508$ -CFTR [14] using CFTR overexpression [15], low temperature [16] and chemicals such as glycerol [17], phenylbutyrate [15], genistein [18] and thapsigargin (Tg) [19]. Tg is a natural tumour-promoting sesquiterpene lactone which increases the intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in several cell lines by inhibiting the sarcoplasmic or ER Ca^{2+} -ATPase family SERCA [20]. Therefore, lowering the ER Ca^{2+} stores induces a decreased retention of $\Delta F508$ -CFTR by chaperones such as calnexin [19]. This decrease in the ER Ca^{2+} store, which is the largest Ca^{2+} store of cells, is accompanied by an increased $[Ca^{2+}]_i$.

We hypothesize that the $\Delta F508$ -CFTR function can also be restored by modulating its interacting partners. Nevertheless, the extent to which Wt-CFTR and $\Delta F508$ -CFTR channels are regulated by protein–protein

* Corresponding authors. Inserm, Unité 613, 46 rue Félix le Dantec, BP62025, 29220 Brest, France. Tel.: +33 02 98 22 36 79; fax: +33 02 98 01 83 42.

E-mail addresses: pascal.trouve@univ-brest.fr (P. Trouvé), claudio.ferec@univ-brest.fr (C. Férec).

interactions is largely unknown. The identification of the CFTR's interacting proteins should permit decoding the molecular mechanisms of the CFTR processing and function and should help to define new therapeutic targets to correct the CFTR defects in CF. Several CFTR-binding proteins are known to modulate the Cl^- channel function of CFTR. SNAP-23 and syntaxin 1A interact with the N-terminus of CFTR and inhibit its activity [21]. Na^+/H^+ exchanger regulatory factor (NHERF), also known as ezrin-binding protein of 50 kDa (EBP-50), and CFTR-associated protein of 70 kDa (CAP70) interact with the C-terminus CFTR via their PDZ domains and stimulate the Cl^- currents [22–24]. CFTR-associated ligand (CAL) also binds the C-terminus of CFTR via a PDZ domain and reduces its apical expression [25]. Recently, we identified annexin A5 (anxA5) as a new CFTR partner. We showed that anxA5 interacts with the NBD1 of the Wt-CFTR protein in a Ca^{2+} - and ATP-dependent manner, as well as with the ΔF508 -CFTR [26]. Our previous study showed that the anxA5 expression is involved in the cAMP-dependent halide flux through CFTR as well as in its membrane localization. AnxA5 belongs to the ubiquitous annexin family of Ca^{2+} -binding proteins [27]. Whereas its role *in vivo* is still unclear, some of its properties have been depicted. It interacts with cytoskeletal proteins [28], exhibits anticoagulant activities [29], inhibits phospholipase A2 [30] and modulates some membrane proteins such as the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger [31]. Furthermore, anxA5 binds to negatively charged phospholipids in a Ca^{2+} -dependent manner [32], may form a Ca^{2+} channel [33] and may be involved in exocytosis [34].

Tg restores the ΔF508 -CFTR in the membrane as well as its Cl^- channel function in a Ca^{2+} -dependent manner [35] and we previously showed that anxA5 interacts with Wt-CFTR and ΔF508 -CFTR in a Ca^{2+} -dependent manner [26]. Therefore, we hypothesized that the effect of Tg may indirectly involve anxA5 by the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In the present paper, we show for the first time that anxA5 is involved in the cell surface localization of the ΔF508 -CFTR and that the Cl^- channel function of the mutated CFTR is increased when anxA5 is overexpressed. Furthermore, we show that the Tg effect is decreased when the anxA5 expression is inhibited whereas it is increased when anxA5 is overexpressed. Therefore, we suggest that the positive effect of Tg involves anxA5 due to its CFTR-binding properties and to its relocalization to the membranes in the presence of Ca^{2+} [32]. Furthermore, we show here that the single effect of an anxA5 overexpression induces an increased ΔF508 -CFTR function due to an increased localization in the plasma membrane of polarized and non-polarized cells, likely due to a reduced recycling. Therefore, we show for the first time that the modulation of anxA5 expression is a potential therapeutic target.

2. Experimental procedures

2.1. Cloning of anxA5 in pcDNA3.1/His

The anxA5 cDNA was amplified by PCR using complete cDNA from HeLa cells as matrix. The primers were: sense 5'-ACCTGAGTAGTCGC-CATGGCA-3'; anti-sense 5'-CCCCGTGACACGGTCATCTTC-3'. Reactions were carried out with the following parameters: denaturation at 94 °C for 15 min, annealing at 62 °C for 30 min and extension at 68 °C for 1.5 min (30 cycles). The PCR products were purified (Qiaex II, Qiagen, Germany) and cloned into pcDNA3.1/His (TOPO TA Expression Kit, Invitrogen, USA). Double-strand sequencing (ABI 310, Applied Biosystems, USA) were performed to ascertain that the amplification did not introduce mistakes and that the coding sequence was in frame.

2.2. Site-directed mutagenesis

Mutagenesis was performed on the cDNA encoding CFTR (GenBank, M28668) using QuickChange® XL Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA). The mutated oligonucleotides (Eurobio, France) corresponding to the ΔF508 mutation were: 5'-CTGGCACCATTAAAGAAATATCGGTGTTTCCTATGATG-3';

5'-CATCATAGGAAACACCGATATTTCTTTAATGGTGCCAG-3'. The mutation was controlled by double-strand sequencing (ABI 310, Applied Biosystems, USA).

2.3. Expression of short hairpin RNA (shRNA)

To decrease the anxA5 expression, a vector was constructed according to the Block-it™ RNAi Designer software (Invitrogen, USA). The single-stranded DNA oligos were: 5'-CACCGAACAAGATGCT-CAGGCTTTACGAATAAAGCCTGAGCATCTTGTC-3', 5'-AAAAGAACAAGATGCTCAGGCTTTATTCGTAAGCCTGAGCATCTTGTC-3'. The annealing to generate two double-strand oligos and their cloning in pENTR/U6 were performed with Block-it™ RNAi Entry vector kit, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). The provided pENTR/U6/LacZ vector encoding an irrelevant shRNA, was used as a negative control. Further controls were performed using an irrelevant scrambled shRNA and with buffer alone (not shown).

2.4. Cell culture and transfection

A549 cells, an immortalized human airway epithelial cell line (ATCC CCL-185, UK), were cultured in F-12K medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and 100 U/ml penicillin–streptomycin in a humidified CO_2 incubator (37 °C). They were transfected by Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) with the pcDNA3.1 containing either the Wt-CFTR or the ΔF508 -CFTR cDNA. Stably transfected cells were selected by neomycin. CFTR expression was assessed after 10 passages. Later, the cells were transfected with pcDNA3.1/anxA5 encoding anxA5 or with the shRNA against anxA5 (pENTR/U6/anxA5). AnxA5 expression was assessed by Western blotting as described below and compared with the negative controls. In some experiments, cells were treated with 500 nM Tg (16 h, 37 °C) [36].

Immortalized normal (16HBE14o-) and CF (CFBE41o-) polarized airway epithelial cell lines were from Pr D.C. Gruenert (University of California, San Francisco). The CFBE41o- cells are homozygous for the ΔF508 mutation whereas the 16HBE14o- cells have the characteristics of superficial epithelial cells and were originally derived by viral transformation of cells dissociated from human bronchial epithelium [37,38]. The cells were cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% FBS and glutamine on an extracellular matrix (CellBind Corning, Bioblock).

2.5. Immunofluorescent labelling of CFTR after modulation of the anxA5 expression in cells with and without Tg treatment

Cells were grown on 22×22 mm glass coverslips and fixed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (w/v) for 30 min at room temperature (RT). The cells were permeabilized (0.25% saponin, 45 min, RT) and saturated (3% bovine serum albumin, 1 h, RT). Immunofluorescence was performed using successively anti-CFTR rabbit polyclonal antibodies (7.5 µg/ml; PA1-935, ABR, BD Bioscience Pharmingen, USA) for 1.5 h and goat anti-rabbit second antibodies coupled to Texas Red (1:250; GeneTex, Inc., USA) for 1 h. Nuclei were stained with DAPI. Actin cytoskeleton was labelled with phalloidin-FluoProbes®547 (1/40, Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Western blot analysis

Cells were lysed (50 mM Tris HCl, pH 6.8, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail [Sigma]) and protein concentrations were determined using the Lowry procedure [39]. The samples were resolved by SDS-PAGE (7.5%) and transferred on a PVDF membrane (Amersham Biosciences, UK). CFTR was detected by successive incubation of the membranes with a mouse monoclonal antibody anti-CFTR (1:500, Ab-2 (MM13-4), Interchim, France) and a peroxidase labelled

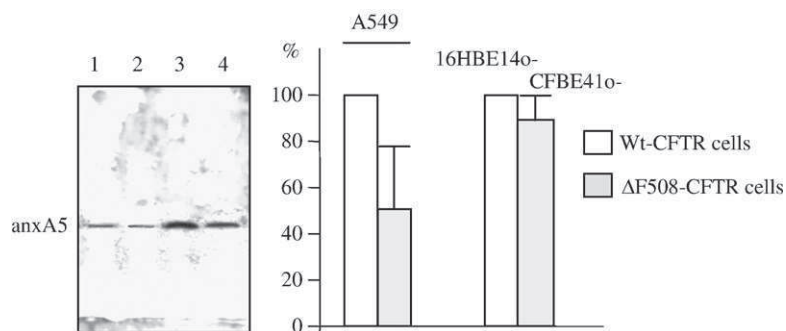


Fig. 1. anxA5 expression in non-polarized (A549) and polarized ΔF508-CFTR-expressing cells (CFBE41o-). The left panel shows an example of western blot representing the expression of anxA5 (35 kDa) in wt-CFTR- and ΔF508-CFTR A549 cells (1 and 2, respectively), in 16HBE14o- (3) and CFBE41o- (4) cells. The right panel shows the corresponding quantification (percentage). The anxA5 levels tended to be lower in ΔF508-CFTR-expressing cells.

secondary antibody (1:5000, Amersham Biosciences, UK). AnxA5 was detected by western blotting (12%) using a goat polyclonal IgG (sc-1929; Santa Cruz Biotechnology, USA) and a peroxidase anti-goat antibody (Sigma, France). Immunoreactive proteins were visualised by enhanced chemiluminescence (ECL+, Amersham Bioscience, UK). Densitometric analysis of the films was performed using a Biovision 1000 apparatus (Fischer Bioblock) and each value was normalized to the total amount of loaded proteins per lane as well as by G3PDH and actin quantifications (MAB to Glyceraldehyde-3-PDH (Biodesin International)). Actin expression was assessed by Western blotting (12%) using anti-nonmuscle-F-actin (1/200, Santa Cruz Biotechnology).

2.7. Immunoprecipitation

Wt-CFTR-anxA5 and ΔF508-CFTR-anxA5 interactions were previously demonstrated [26]. The effect of the ΔF508 mutation upon the interaction was studied here by co-immunoprecipitation. Total protein was extracted from Wt-CFTR- and ΔF508-CFTR-expressing cells (50 mM Tris HCl, pH 6.8, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail). The anti-CFTR antibody (Ab-2 (MM13-4), Interchim, France) was coupled to Dynabeads Protein G (Dyna Beads, Invitrogen, USA) overnight at 4 °C with rotation. After centrifugation (6000 g, 15 min), clarified cell lysates were incubated with the beads. After incubation (16 h, 4 °C), the beads were washed four times in PBS and samples were resolved by SDS-PAGE (12%). AnxA5 was detected with the anti-anxA5 antibody. The commercially available purified anxA5 was used as molecular weight control (35 kDa). The negative controls were obtained with cells which did not express CFTR and using an irrelevant antibody (anti-V5 antibody, Invitrogen, USA) coupled to the beads.

2.8. Measurement Fura 2-AM

To ensure that the Tg treatment induced an increased $[Ca^{2+}]_i$, Wt-CFTR- and ΔF508-CFTR-expressing cells were loaded for 45 min with 2 μM Ca^{2+} -sensitive fluorescent probe fura-2 acetoxy-methyl ester (Fura-2 AM, Invitrogen Molecular Probes, USA) at RT in the dark. Cells were rinsed twice and incubated in Tyrode solution (20 min, 37 °C). Fluorescence was recorded at 340 nm (saturated Ca^{2+}) and 380 nm (free Ca^{2+}) and was analysed using Fluostar software (IMSTAR, France). For each experiment, 20–30 cells were observed and the responses were compared with the controls obtained with untransfected cells or with cells that were not treated with Tg.

2.9. Methoxy-N-(3-sulfopropyl)quinolinium (SPQ) fluorescence assay

The cAMP-dependent halide flux through Wt-CFTR and ΔF508-CFTR was assessed by SPQ assays using forskolin as a CFTR activator. Cells were loaded with 10 mM SPQ (Molecular Probes) and placed in a quenching NaI buffer. The baseline fluorescence was measured in isotonic NaI buffer and cells were then perfused with isotonic dequench buffer

($NaNO_3$ replaced NaI). The perfusate was then switched to dequench buffer plus agonist and requenched at the end of the experiments. An inverted microscope equipped for fluorescence (IX-71, Olympus) was used and illumination was performed at 360 nm. The emitted light was collected at 456 ± 33 nm by a high-resolution image intensifier coupled to a video camera connected to a digital image processing board (FLUO software, Imstar, France). During the experiments ($n=5$) the cell morphology and number were checked to ensure that there was no difference due to the siRNA. SPQ experiments were also performed when anxA5 was overexpressed in cells transfected or not with the cDNA encoding CFTR. The controls were performed using cells transfected with the empty pcDNA3.1 vector. For the statistical analysis [40,41], fluorescence intensity was standardized according to the equation $F = (F - F_0) / F_0 \times 100$, where F is the relative fluorescence and F_0 , the fluorescence intensity measured in presence of I^- . The halides membrane permeability (P) was determined as the rate of SPQ dequenching upon perfusion with nitrates. At least three successive data points were collected immediately after the NO_3^- containing medium application, and then fitted using a linear regression analysis. The slope of the straight line reflecting the membrane permeability to halides (noted P in min^{-1}) was used as an index of CFTR activity.

2.10. Patch clamp

A patch-clamp technique was used to record the membrane currents under voltage clamped conditions [42]. The measurements of ionic currents were made by using a patch-clamp amplifier (Geneclamp 500B, Axon, USA) equipped with a current to voltage converter headstage (CV5 series). The signals were recorded with a micro-computer via an analogue to digital converter (CED 1401 plus, UK) running at 35 kHz. The WCP v. 3.5.9 program (Strathclyde University, UK) was used to record the currents and to deliver programmed voltage pulses. The stimulating pulses (–50 to 200 mV by 10 mV steps, duration 200 ms) were applied to the patch from the holding potential. The currents were analysed off-line with WCP and conductances were calculated from the slope of the current–potential relationship.

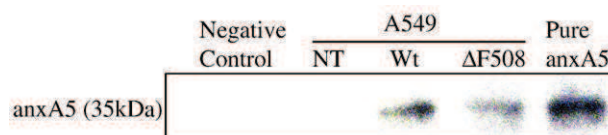


Fig. 2. Co-immunoprecipitation of anxA5 with Wt-CFTR and ΔF508-CFTR. CFTR protein was immunoprecipitated from Wt-CFTR- and ΔF508-CFTR-expressing A549 cells. The complexes were resolved by SDS/PAGE (12%) and transferred onto a PVDF membrane. AnxA5 was then detected by immunoblotting and was observed in the complexes. It was not detected in the complex from A549 cells which did not express CFTR (NT) or when an irrelevant antibody was linked on the beads (negative control). Pure anxA5 was used as molecular weight control (35 kDa).

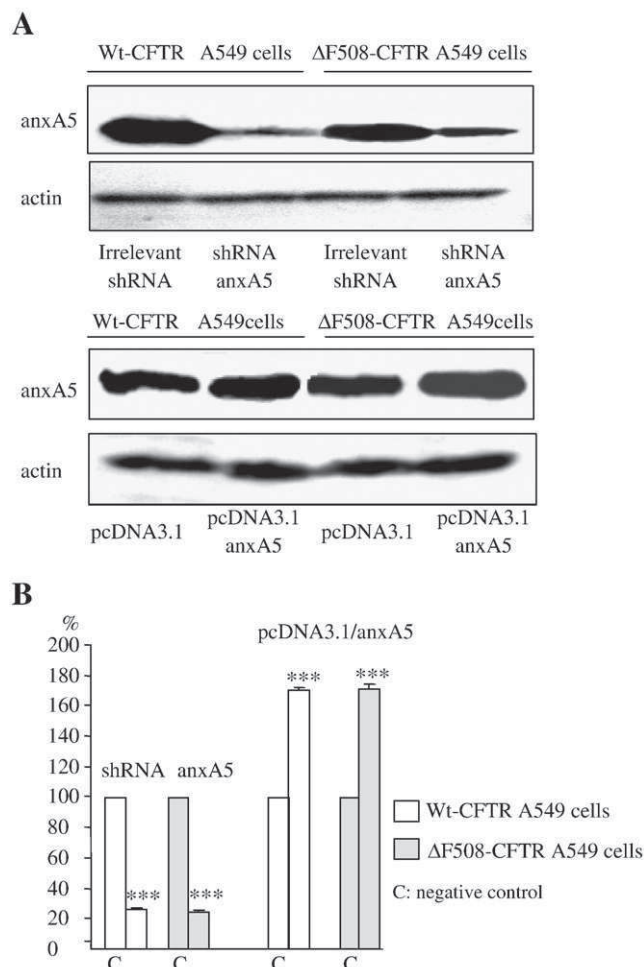


Fig. 3. Modulation of anxA5 expression in A549 cells. Example of detection of anxA5 in Wt-CFTR- and ΔF508-CFTR-expressing A549 cells by Western blotting. (A) Wt-CFTR and ΔF508-CFTR-expressing A549 cells were transfected with either the shRNA directed against anxA5 or the irrelevant shRNA. Decreased anxA5 expression was observed in both cell types in the presence of its specific shRNA, when compared to the control (upper panel). Overexpression of anxA5 was obtained in Wt-CFTR and ΔF508-CFTR-expressing-A549 cells by transfection with the cDNA encoding anxA5 (lower panel). 48 h after the transfection, anxA5 expression was increased in both cell types when compared with the control (empty pcDNA3.1 vector). (B) Representative histograms (percentage) showing the statistical decreased anxA5 expression due to the shRNA and its significant increase in transfected cells. (***: $p < 0.001$).

This procedure was performed with 75% confluent cells incubated with 500 nM Tg (16 h, 37 °C). In all experiments, cells were pre-treated with bumetamide as described above. In order to assess the CFTR activity in electrophysiological recordings, glibenclamide was used to block CFTR activity (data not shown).

2.11. Cell surface expression of CFTR by biotinylation

To estimate the CFTR (Wt and ΔF508) presence in the plasma membranes of the cells after modulation of anxA5 expression, coupled or not to a Tg treatment, the membrane proteins were biotinylated as previously described [43,44]. Briefly, confluent cells were washed with ice-cold PBS (pH 8.0), incubated in Sulfo-NHS-SS-Biotin solution (Pinpoint™ Cell Surface Protein Isolation Kit, Pierce, USA) for 30 min at 4 °C and quenching solution was added. Cells were scraped and centrifuged (3 min, 500 g). The pellets were suspended in lysis buffer (Tris-HCl pH 6.8, 50 mM; NaCl 100 mM; Triton X-100 2% and antiprotease cocktail) and incubated for 30 min on ice. Cell lysates were clarified (2 min, 10,000 g, 4 °C) and biotinylated proteins were isolated on Immobilized NeutrAvidin™ gel according to the manufac-

turer's instructions (Pierce, USA). The CFTR protein was further detected by Western blotting as described above.

2.12. Statistical analysis

Student's *t*-test was used and differences were considered significant when $p < 0.05$ (*) and very significant when $p < 0.001$ (**).

3. Results

3.1. AnxA5 expression in non-polarized (A549) and polarized ΔF508-CFTR-expressing cells (CFBE41o-)

The basal anxA5 expression was assessed in A549 and in CFBE41o- cells by western blots. As shown in Fig. 1, anxA5 expression was higher in polarized cells than in non-polarized cells. Although it was not significant, this expression tended to be lower in ΔF508-CFTR-expressing cells.

3.2. The ΔF508 mutation does not disrupt the CFTR-anxA5 interaction

We previously showed direct anxA5-CFTR and anxA5-ΔF508-CFTR interactions [26]. Nevertheless, the presence of anxA5 in Wt-CFTR and in the ΔF508-CFTR protein complex was assessed here by co-immunoprecipitation. As shown in Fig. 2, anxA5 was present in the immunoprecipitated complexes from Wt-CFTR- and ΔF508-CFTR-expressing A549 cells, whereas it was not detected in the A549 cells which were not transfected with the cDNA encoding for the CFTR protein (NT) or when an irrelevant antibody was linked to the beads. This result indicated that the ΔF508 mutation did not disrupt the interaction. Pure anxA5 protein was used as molecular weight control to ensure the molecular weight of the observed bands.

3.3. Modulation of the anxA5 expression in Wt-CFTR- and ΔF508-CFTR-expressing A549 cells

To decrease the anxA5 expression, Wt-CFTR- and ΔF508-CFTR-expressing A549 cells were transfected with either the shRNA directed against anxA5 or the control shRNA. After the transfection (48 h),

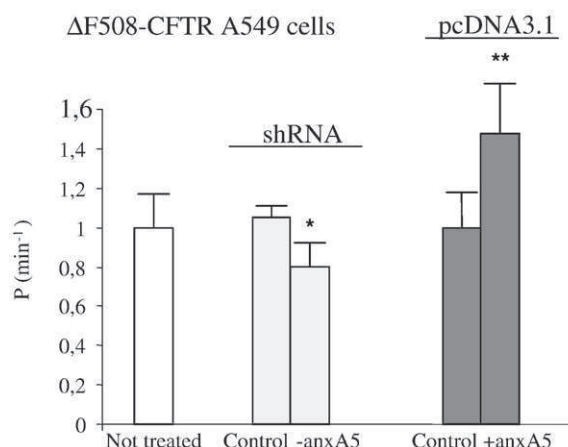


Fig. 4. Effect of the modulation of anxA5 expression upon the cAMP-dependent halide flux through ΔF508-CFTR in A549 cells. Bar graph representation of the effect of the decreased and increased anxA5 expression upon the cAMP-dependent halide flux through ΔF508-CFTR in A549 cells channel which was measured by fluorescence digital imaging microscopy using SPQ dye. The obtained curves were used to determine the halide permeability (P) as the rate of SPQ dequenching in NO₃⁻ medium under baseline conditions and under cAMP stimulation. When anxA5 expression was decreased the cAMP-dependent halide flux through ΔF508-CFTR in A549 cells was significantly decreased when compared to the control (light grey). When anxA5 was overexpressed, the halide flux was significantly increased (dark grey). Comparison with non-treated ΔF508-CFTR-expressing A549 cells (white) indicate that the controls did not modify the halide flux. Bars represent SEM, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$.

anxA5 expression was assessed by Western blotting (Fig. 3A, upper panel). AnxA5 overexpression was obtained after transfection with the cDNA encoding anxA5 (pcDNA3.1/anxA5, Fig. 3A, lower panel). The pcDNA3.1 empty vector was used as a negative control. AnxA5 expression was assessed at increasing time points after the transfection (not shown), and peaked 48 h after transfection. In all type of experiments, actin was used as a reference gene (Fig. 3A). The statistical analysis was performed (Fig. 3B). AnxA5 expression was decreased in the presence of the shRNA by $73.5 \pm 1.1\%$ ($n=3$) and $75.6 \pm 1.8\%$ ($n=3$) in Wt-CFTR- and $\Delta F508$ -CFTR-expressing cells, respectively, when compared to the controls. Its expression was increased in the presence of the cDNA encoding anxA5 by $69.8 \pm 0.8\%$ and $71.4 \pm 1.2\%$ in Wt-CFTR- and $\Delta F508$ -CFTR-A549 expressing cells, respectively, when compared to the controls.

Because anxA5 is an actin-binding protein and because actin is involved in CFTR function, actin expression was studied. Actin expression was not modified in Wt-CFTR- or $\Delta F508$ -CFTR-expressing cells when anxA5 expression was modulated (not shown).

3.4. The cAMP-dependent halide flux through $\Delta F508$ -CFTR depends on anxA5 expression in A549 cells

We previously showed that the cAMP-dependent halide flux through Wt-CFTR was correlated with anxA5 expression in A549 cells [26]. Therefore, we investigated the cAMP-dependent halide flux

through $\Delta F508$ -CFTR when anxA5 expression was decreased and increased. Halide permeability was measured using the SPQ dye 48 h after the transfection with pENTR/U6/anxA5 or with the irrelevant shRNA. The curves obtained after cAMP stimulation of the CFTR channel and the blockage of other Cl^- channels showed a residual function of $\Delta F508$ -CFTR, as previously described [12]. Statistical analysis of the experiments (Fig. 4) indicated that the shRNA induced a significant decreased halide flux through $\Delta F508$ -CFTR in A549 cells when compared to the negative controls performed with the irrelevant shRNA which had no effect by itself.

The overexpression of anxA5 induced a very significant increased cAMP-dependent halide flux through $\Delta F508$ -CFTR in A549 cells (Fig. 4). In the controls performed with cells which did not express CFTR (not shown) and with the empty vector, no modification of the halide flux was observed. Therefore, our results indicate for the first time that the cAMP-dependent halide flux through $\Delta F508$ CFTR is correlated with anxA5 expression.

3.5. Tg treatment increases Wt and $\Delta F508$ -CFTR channel activity

It was previously shown that Tg increases the cell surface expression of $\Delta F508$ -CFTR due to the decreased ER Ca^{2+} store affecting the calnexin-CFTR interaction [35]. In a previous study, we demonstrated that the anxA5-CFTR interaction is Ca^{2+} -dependent [26]. These data, together with the known anxA5 relocalization in the membrane

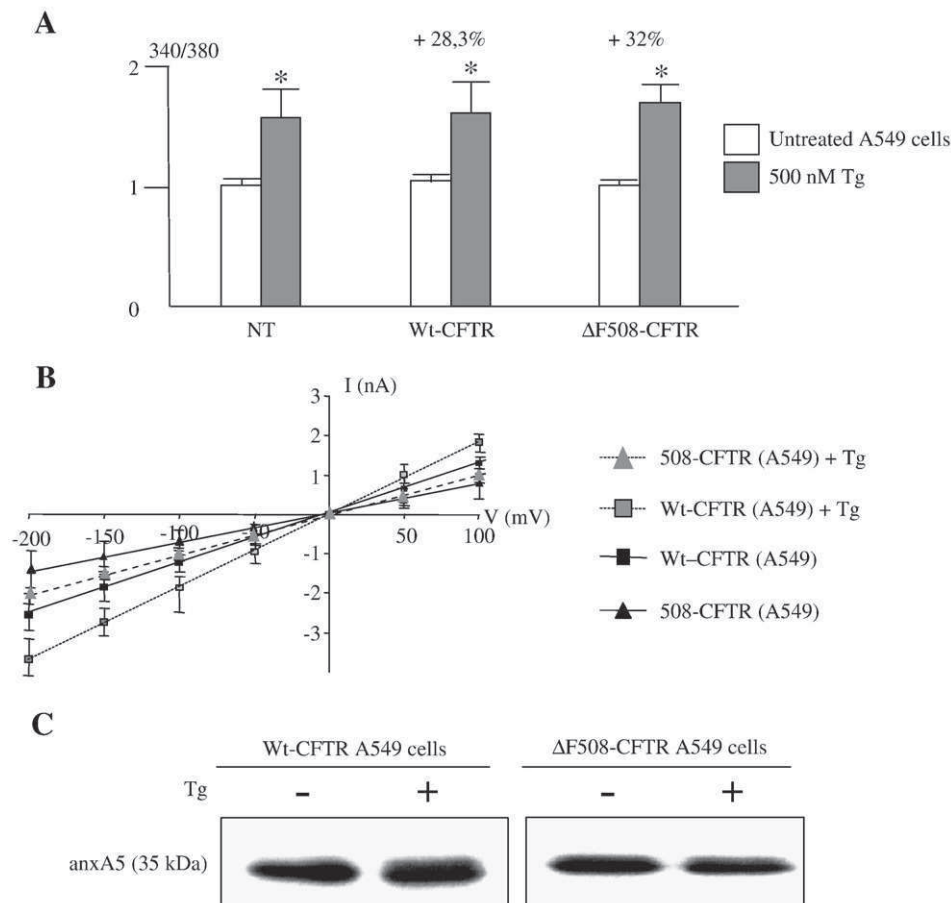


Fig. 5. Study of the effect of Tg in Wt-CFTR- and $\Delta F508$ -CFTR-expressing A549 cells. (A) The effect of Tg upon $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was checked by Fura 2-AM measurement. Non-transfected A549 cells, Wt-CFTR- and $\Delta F508$ -CFTR-expressing A549 cells were loaded with Fura-2 AM after Tg treatment. For each cell type, fluorescence was recorded at 340 nm (saturated calcium) and 380 nm (free calcium) and compared with that of untreated cells. In all cell types, Tg induced a significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Bars represent SEM ($n=5$). (B) The effect of Tg upon the Cl^- channel function of Wt-CFTR and $\Delta F508$ -CFTR was measured by patch-clamp. The I/V relationships show that in both Wt-CFTR- and $\Delta F508$ -CFTR-expressing cells, Tg increased CFTR channel function. Cells which did not express CFTR and untreated cells were used as negative controls. Bars represent SEM. (C) Analysis of Tg effect on anxA5 expression in Wt-CFTR- and $\Delta F508$ -CFTR-expressing A549 cells by Western blotting. Tg treatment did not modify anxA5 expression in either cell type. The same amount of protein was loaded in each lane (50 μg).

in the presence of Ca^{2+} , led us to postulate that Tg-induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ could increase the Cl^- channel activities of CFTR. To test this hypothesis, we studied the CFTR channel activity in A549 cells when anxA5 expression was modulated in the presence or absence of Tg. We first checked that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was increased in our cell model after Tg treatment (16 h) using Fura 2-AM. As shown in Fig. 5A, a significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ caused by Tg was observed in the A549 cells expressing the Wt-CFTR ($+29.3 \pm 1.8\%$) or the ΔF508 -CFTR ($+32 \pm 1.2\%$) protein, when compared with untreated cells.

The Cl^- channel activity of CFTR was measured by patch-clamp in Wt-CFTR- and ΔF508 -CFTR-expressing A549 cells after Tg treatment. Untransfected and untreated A549 cells were used as negative controls (not shown). As shown in Fig. 5B, the I/V relationship obtained indicates that the Cl^- channel function of both the Wt-CFTR and the ΔF508 -CFTR was increased in the presence of Tg in A549 cells.

This result was in accordance with previous results [19,35]. As shown in Fig. 5C, Tg had no effect upon anxA5 expression, which could have explained the increased Cl^- channel activity of both Wt-CFTR and ΔF508 -CFTR in this cell types.

3.6. AnxA5 overexpression enhances the Tg effect in ΔF508 -CFTR-expressing A549 cells

The combined effect of Tg and modulation of anxA5 expression was studied in the ΔF508 -CFTR-expressing A549 cells. In a first set of experiments, we found that Tg treatment, shRNA and anxA5 overexpression had no effect upon Cl^- flux in the cells that did not express the CFTR protein (not shown).

The Cl^- channel activity of CFTR was assessed by the cell-attached patch-clamp technique. Fig. 6A shows the experimental conditions

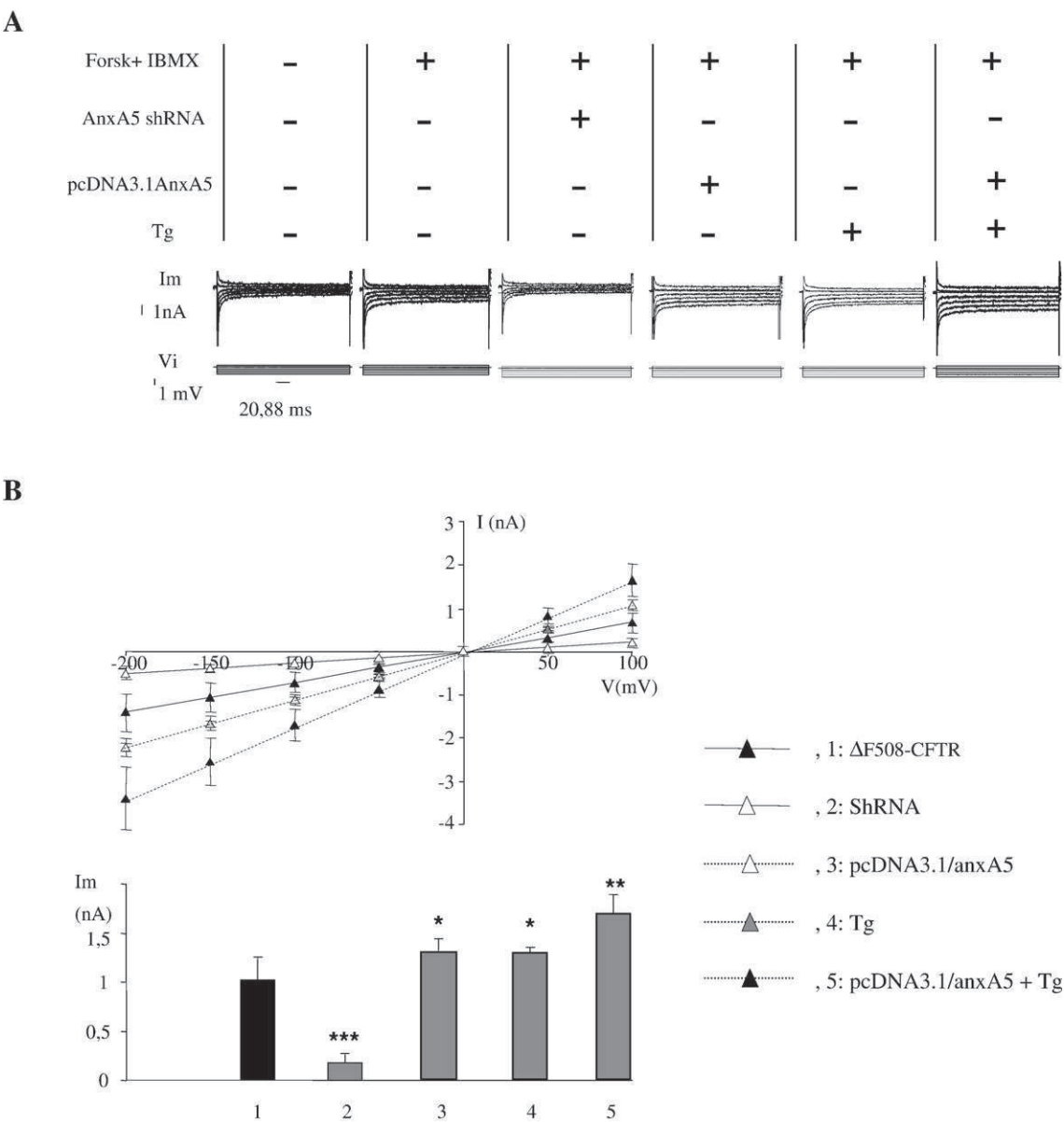


Fig. 6. Cell-attached patch-clamp experiments performed in ΔF508 -CFTR-expressing A549 cells submitted to different levels of anxA5 expression in native conditions and after Tg treatment. (A) The upper panel indicates the cell conditions used in the patch-clamp analysis. The upper waveforms trace currents recorded in each set of experimental conditions are representative of the currents recorded in ΔF508 -CFTR before (basal currents) and after cAMP stimulation underexpressing or overexpressing anxA5 with or without Tg in A549 cells. The lower trace represents the voltage steps applied to the membrane. Horizontal bar, 20.88 ms; vertical bars, 1 nA (top) and 1 mV (bottom). (B) I/V relationship in all experimental conditions (mean $\pm$ SEM, $n=5$) at +60 mV in all experimental conditions. The conditions where only forskolin and IBMX were applied to the cells were taken as reference for the analysis. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$.

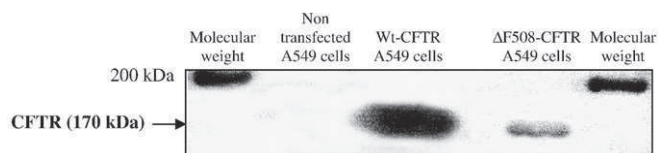


Fig. 7. Cell surface detection of Wt-CFTR and Δ F508-CFTR by biotinylation in A549 cells. Cell surface proteins of the cells expressing Wt-CFTR or Δ F508-CFTR were labelled by biotinylation, purified and analysed by Western blotting (7% gel electrophoresis). The mature CFTR (170 kDa) band is observed and is stronger in Wt-CFTR-expressing A549 cells than in Δ F508-CFTR A549 cells. Non-transfected A549 cells which do not express CFTR were used as negative controls and the same amount of protein was loaded in each lane.

and an example of the corresponding waveform trace currents. The recordings showed that the forskolin treatment stimulated the Δ F508-CFTR Cl^- channel activity. The response of Δ F508-CFTR channels to the stimulation was lower than that of Wt-CFTR (not shown). These results can be correlated with those obtained in SPQ experiments. The patch-clamp recordings were converted to current-potential (I/V) relationship representations (Fig. 6B). When *anxA5* expression was reduced in A549 cells the slope of the curves was decreased, indicating a reduced channel activity of Δ F508-CFTR. Conversely, the slopes of the curves were increased when *anxA5* was overexpressed or when cells were treated with Tg. Finally, the slopes of the curves were increased when *anxA5* was overexpressed in Tg-treated cells when compared with those of cells only submitted to Tg treatment or to *anxA5* overexpression alone. The lower panel in Fig. 6B represents the current amplitudes (at +60 mV) and highlights statistical differences. The results show that the *anxA5* expression reduced by shRNA significantly decreased the channel activities of the Δ F508-CFTR which function was significantly enhanced when *anxA5* was overexpressed. It was further increased when *anxA5* overexpression was coupled to the Tg treatment, when compared with the effect of each treatment singly applied. For each experiment, controls were performed with the irrelevant shRNA, with the empty vector and with non-transfected cells (not shown).

In conclusion, these experiments show for the first time that *anxA5* protein is intimately involved in the Cl^- channel function of Δ F508-CFTR. Finally, we demonstrate here that increasing *anxA5* expression improved the effect of Tg upon the Δ F508-CFTR channel activity.

3.7. *AnxA5* overexpression enhances the cell surface expression of both Wt-CFTR and Δ F508-CFTR

To determine whether the increased Cl^- currents were due to an increased channel activity or to an increased cell surface expression of the CFTR protein, the cell surface localization of the Δ F508-CFTR proteins was analysed by immunofluorescence studies (not shown) and by cell surface biotinylation experiments [43,44].

In immunofluorescence experiments we observed that the irrelevant shRNA had no effect upon the Δ F508-CFTR localization whereas the shRNA directed against *anxA5* induced its decreased membrane localization (not shown). We confirmed that Tg increases the cell surface expression of the Δ F508-CFTR [19] and showed that this positive effect was conserved when *anxA5* expression was reduced.

When *anxA5* was overexpressed, with or without Tg, Δ F508-CFTR localization was increased in the cell membrane. *AnxA5* modulation had no effect upon actin distribution.

We confirmed these results by biochemical assays. The total cell surface proteins were biotinylated, purified on a streptavidin column and the CFTR protein was detected in collected fractions by Western blotting. As shown in Fig. 7, CFTR was observed in the membrane in the Wt-CFTR-expressing A549 cells, whereas a faint band was observed in the membrane proteins from the Δ F508-CFTR-expressing A549 cells, consistent with the retention and degradation of most of

the mutated protein in the ER. The effect of the decreased *anxA5* expression on the cell surface expression of CFTR in Wt-CFTR- and Δ F508-CFTR-expressing cells was assessed. When *anxA5* expression was decreased, membrane expression of both Wt-CFTR and Δ F508-CFTR proteins was inhibited (Fig. 8).

Wt-CFTR and Δ F508-CFTR membrane localization was further studied when *anxA5* was overexpressed in A549 cells. As shown in Fig. 9, a faint band was observed in Wt-CFTR- and Δ F508-CFTR-expressing cells after transfection with the empty vector used as control. These bands were stronger when *anxA5* was overexpressed. Therefore, *anxA5* overexpression increased the cell surface expression of both Wt-CFTR and Δ F508-CFTR proteins. This cell surface expression of both Wt-CFTR and Δ F508-CFTR was increased when *anxA5*-overexpressing cells were treated with Tg. In summary, the cell surface expression of Wt-CFTR and Δ F508-CFTR proteins was decreased in the absence of *anxA5* expression and, conversely, was increased when *anxA5* protein was overexpressed and Tg enhanced the Δ F508-CFTR expression in plasma membrane in *anxA5*-overexpressing A549 cells.

3.8. Modulation of *anxA5* expression in polarized cells

Our results were extended in the polarized cell line CFBE41o- in which *anxA5* expression was modulated. As shown in Fig. 10A, shRNA induced a significant *anxA5* decreased expression whereas a significant *anxA5* overexpression was observed in the presence of the cDNA encoding *anxA5*. SPQ experiments were performed in the CFBE41o- cells when *anxA5* expression was modulated. As shown in Fig. 10B, the cAMP-dependent halide flux was significantly decreased when *anxA5* expression was inhibited. The *anxA5* overexpression induced significant increased cAMP-dependent halide flux in CFBE41o- cells. Therefore, the results were similar in non-polarized and in polarized cells. Biotinylation experiments performed in the CFBE41o- cells overexpressing *anxA5* indicated that the increased cAMP-dependent halide flux was likely due to an increased Δ F508-CFTR localization in the apical membranes in these polarized cells (Fig. 10C, left panel). Immunolocalization of the CFTR protein was performed in the CFBE41o- cells when *anxA5* expression was increased (Fig. 10C, right panel). A faint increased localization of the mutated CFTR in the plasma membrane was observed when compared with cells transfected with the empty vector. Therefore immunofluorescence was in accordance with the biotinylation experiments.

4. Discussion

The proteins or drugs that might increase the cell surface expression of the Δ F508-CFTR are potential targets to correct the Cl^-

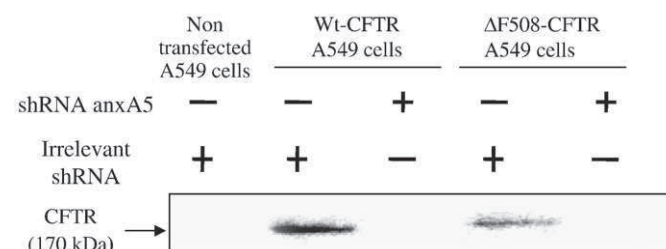


Fig. 8. Cell surface detection of Wt-CFTR and Δ F508-CFTR by biotinylation, when *anxA5* expression is reduced. When both Wt-CFTR- and Δ F508-CFTR-expressing A549 cells were transfected by the irrelevant shRNA, cell surface expression of CFTR protein was detected in membrane proteins after biotinylation and Western blotting. CFTR was not detected in membrane proteins from non-transfected cells (negative control). The plasma membrane expression of Wt-CFTR and Δ F508-CFTR in A549 cells was observed when the irrelevant shRNA was transfected, whereas neither protein was detected when *anxA5* expression was reduced. The same amount of protein was loaded in each lane.

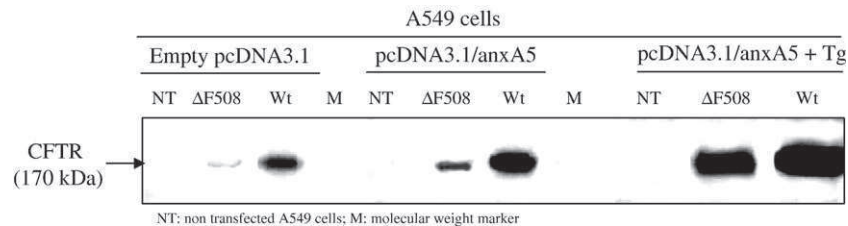


Fig. 9. Cell surface detection of Wt-CFTR and Δ F508-CFTR in A549 cells by biotinylation, when anxA5 is overexpressed, with and without Tg. Biotinylation experiments and CFTR detection were performed. When anxA5 is overexpressed, both Wt-CFTR and Δ F508-CFTR are detected in membrane proteins at a higher level when compared with the empty vector transfected cells. The cell surface expression of Wt-CFTR and Δ F508-CFTR in A549 cells is further increased in the presence of Tg. A549 cells which did not express the CFTR proteins (NT) were used as a negative controls.

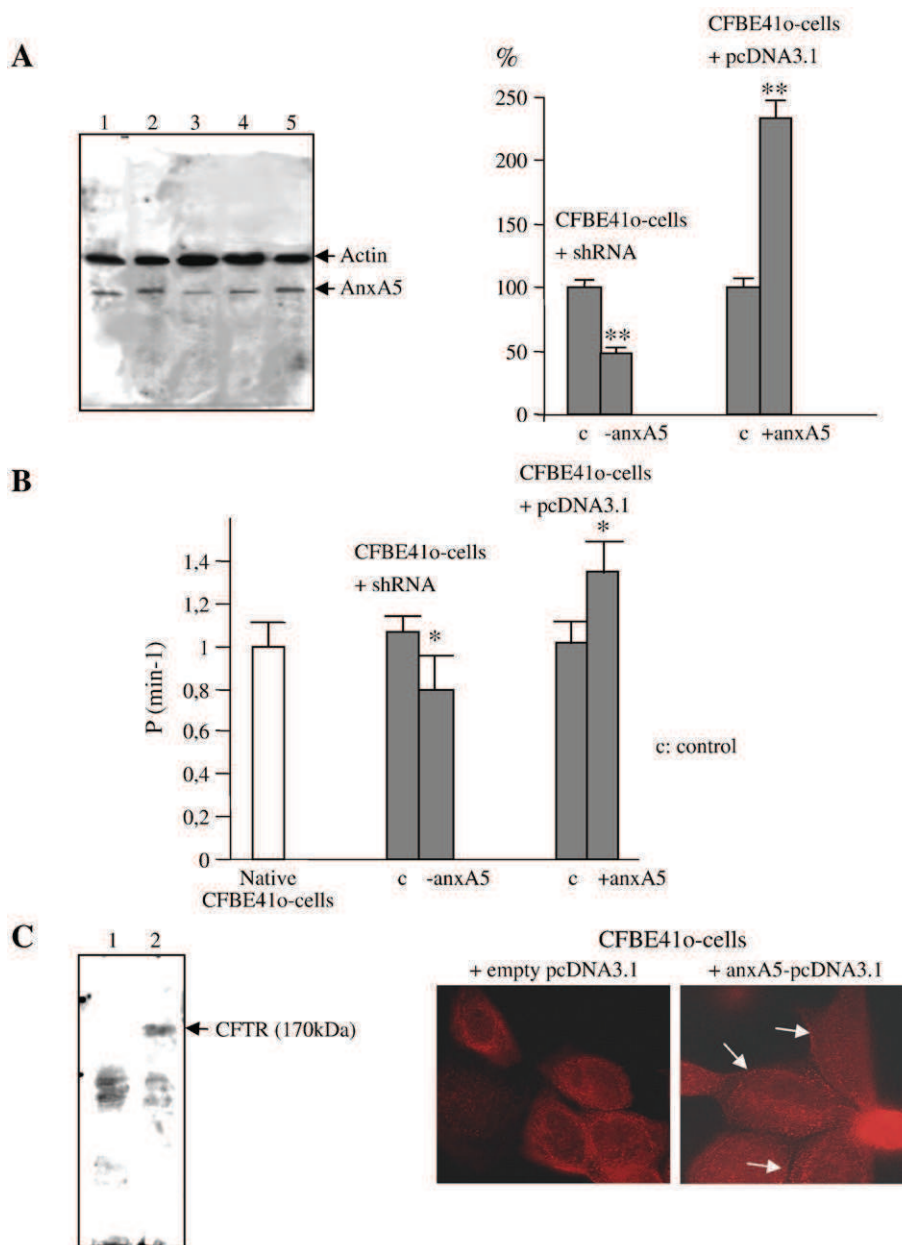


Fig. 10. Modulation of anxA5 expression in polarized cells (CFBE41o-). (A) Example of western blot (left panel) performed to assess the expression of actin and anxA5 in 16HBE14o- (1) and in CFBE41o- cells (2–5). CFBE41o- cells were transfected with either the control shRNA (2), the shRNA directed against anxA5 (3), the control plasmid (4) and the cDNA encoding anxA5 (5). The anxA5 expression was quantified (right panel) showing that the shRNA induced a significant anxA5 decreased expression whereas a significant anxA5 overexpression was observed in the presence of the cDNA encoding anxA5. (B) SPQ experiments were performed in CFBE41o- cells and P (min⁻¹) was calculated as described above. The cAMP-dependent halide flux was significantly decreased when anxA5 expression was inhibited and it was increased when anxA5 was overexpressed. (C) Biotinylation experiments were performed as described above and CFTR was detected by immunoblotting. In CFBE41o- cells transfected with the control cDNA, the CFTR protein was not distinguished (1) whereas it was observed in the cells overexpressing anxA5 (2). Immunofluorescence was performed in CFBE41o- cells which were transfected with the empty vector, CFTR was observed mainly around the nuclei (left image). In the CFBE41o- cells which were transfected with the cDNA encoding anxA5, a faint labelling in the membrane was observed (right image).

currents in CF. Because anxA1 is down-regulated in CF patients [45], because annexin 2 belongs to the functional complex of CFTR [46], and because anxA5 is overexpressed in CF epithelial cells from foetal trachea [47], annexins are involved in CF. In a previous study we identified anxA5 as a Ca^{2+} -dependent partner of CFTR whose expression was necessary for the CFTR membrane localization and channel function [26]. This led us to investigate whether anxA5 has any effect upon ΔF508 function or membrane localization.

The present study was performed in A549 cells, an immortalized human airway epithelial cell line which is routinely used as a model of pulmonary epithelium despite they are not polarized [26,48]. The cells were stably transfected with the cDNA encoding the Wt-CFTR or ΔF508 -CFTR proteins. Functional studies, immunofluorescent labelling and biotinylation assays showed that the Wt-CFTR was functional at the cell surface, whereas a small fraction of functional ΔF508 -CFTR channels reached the cell surface, according to the previously described cell model [26].

Because anxA5 expression is necessary for CFTR function and because anxA5 interacts with both the normal and mutated CFTR, we hypothesized that anxA5 could also regulate the function and membrane localization of ΔF508 -CFTR. To test this hypothesis, we modulated anxA5 expression in both Wt-CFTR- and ΔF508 -CFTR-expressing cells. The results showed that the decreased anxA5 expression reduced the Cl^- channel activities of both Wt and ΔF508 -CFTR channels whereas they were increased when anxA5 was overexpressed. Nevertheless, these experiments did not show whether anxA5 regulates the channel activity or the plasma membrane expression of CFTR. Therefore, its cell surface expression was analysed. Our results show that anxA5 underexpression decreases the cell surface localization of both normal and mutated channels and that its overexpression increases it, suggesting that the membrane expression of CFTR in polarized and non-polarized cells depends on anxA5 expression. These data led us to hypothesize that anxA5 might be involved in the regulation of the CFTR trafficking or in its stability in the plasma membrane. Indeed, annexins are involved in membrane organization, membrane trafficking and membrane-cytoskeleton-linkage [49]. Furthermore, the main property of anxA5 is to bind to negatively charged phospholipids of the plasma membrane and to the membranes of the biosynthetic or endocytic pathway, in a Ca^{2+} -dependent manner [32]. Therefore, because anxA5 binds to both Wt and ΔF508 -CFTR and increases their cell surface expression and because annexins are involved in membrane trafficking, we hypothesize that anxA5 might regulate CFTR trafficking to the cell surface. Because anxA5 is a non-membrane-aggregating annexin [50], we speculate that it is involved in the stability of CFTR in the plasma membrane rather than in the trafficking process. Moreover, because anxA5 is involved in the stabilization of the membranes [51], because it binds to the membranes and to actin, because it regulates the function and the distribution of membrane glycoproteins [52] and because CFTR binds to actin [53], we suggest that anxA5 belongs to the three-dimensional network that might stabilize the mutated CFTR at the cell surface increasing its half-life in the plasma membrane. This could explain why the cell surface expression of both Wt-CFTR and ΔF508 -CFTR depends on anxA5 expression. The findings that increased anxA5 expression leads to the transport of ΔF508 -CFTR to the plasma membrane seem in contradiction with the results showing an increased anxA5 expression in fetal CF cells. Nevertheless, the expression of CFTR-specific mRNA is approximately 75-fold greater in the fetal lung than in the adult lung and anxA5 accumulates almost linearly from birth to adulthood. Because anxA5 expression tends to be higher in CF cells, our hypothesis that it may in act upon the constitutive internalization and recycling of CFTR.

Since the anxA5–CFTR interaction and the anxA5 relocation to the plasma membrane both depend on $[\text{Ca}^{2+}]_i$, we hypothesized that increasing the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ might help to maintain the cell surface expression of both Wt and ΔF508 -CFTR. This was tested using Tg,

the most widely used SERCA inhibitor, which increases the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by mobilizing the sequestered ER calcium stores. Furthermore, Tg induced the redistribution of the ΔF508 -CFTR from the ER to the apical membrane [19,35] by disrupting the interaction between the newly synthesized CFTR and calnexin, a Ca^{2+} -dependent chaperone protein involved in ΔF508 -CFTR retention in the ER. We suggest that anxA5 could be involved in the positive effect of Tg hitherto only attributed to the disruption of the calnexin– ΔF508 -CFTR interaction.

In the present study, we demonstrate that Tg increases the cell surface expression of both Wt and the mutated CFTR in A549 cells. However, this effect was decreased when anxA5 expression was reduced, but was not totally abolished. This indicates that the positive effect of Tg involves anxA5. Because Tg does not induce increased anxA5 expression, this effect is likely due to the previously described relocation of anxA5 to the membrane when $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is increased.

In conclusion, because anxA5–CFTR, anxA5–membrane and anxA5–actin interactions are regulated by $[\text{Ca}^{2+}]_i$, we suggest that the increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by Tg might enhance the formation of the three-dimensional network. So, enhancement of anxA5 expression may increase the presence of the mutated CFTR protein in the plasma membrane where it exhibits some Cl^- channel functions.

This study shows for the first time that anxA5, which interacts with the NBD1 of the CFTR [26], regulates the cell surface expression of both the Wt and the mutated CFTR by increasing their presence in the plasma membrane in polarized and in non-polarized cells. We show that an increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induces an increased anxA5 effect upon CFTR function. Therefore we propose a synergic and Ca^{2+} -dependent effect between Tg and anxA5. This positive effect of anxA5 has now to be taken into account when drugs such as Tg are used in order to restore the function of a mutated protein which is released from the ER. Furthermore, we propose that increased anxA5 expression *in vivo* might partially correct the altered Cl^- channel in CF.

Acknowledgement

This work was supported by grants from the Association Gaëtan Saleun.

References

- [1] J.R. Riordan, J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA, *Science* 245 (1989) 1066–1073.
- [2] J.M. Rommens, M.C. Iannuzzi, B. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, M. Zciga, M. Buchwald, J.R. Riordan, L.C. Tsui, F.S. Collins, Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping, *Science* 245 (1989) 1059–1065.
- [3] L.C. Tsui, Tracing the mutations in cystic fibrosis by means of closely linked DNA markers, *Am. J. Hum. Genet.* 44 (1989) 303–306.
- [4] D.C. Gadsby, A.C. Nairn, Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis, *Physiol. Rev.* 79 (1999) S77–S107.
- [5] P.M. Quinton, Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective, *Physiol. Rev.* 79 (1999) S3–S22.
- [6] The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis, *N. Engl. J. Med.* 329 (1993) 1308–1313.
- [7] M.J. Welsh, A.E. Smith, Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis, *Cell* 73 (1993) 1251–1254.
- [8] S.H. Cheng, R.J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D.W. Souza, G.A. White, C.R. O'Riordan, A.E. Smith, Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis, *Cell* 63 (1990) 827–834.
- [9] C.L. Ward, S. Omura, R.R. Kopito, Degradation of CFTR by the ubiquitin–proteasome pathway, *Cell* 83 (1995) 121–127.
- [10] S. Pind, J.R. Riordan, D.B. Williams, Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 12784–12788.
- [11] Y. Yang, S. Janich, J.A. Cohnand, J.M. Wilson, The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 9480–9484.
- [12] G.D. Heda, M. Tanwani, C.R. Marino, The Delta F508 mutation shortens the biochemical half-life of plasma membrane CFTR in polarized epithelial cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280 (2001) C166–C174.

- [13] C. Li, M. Ramjeeasingh, E. Reyes, T. Jensen, X. Chang, J.M. Rommens, C.E. Bear, The cystic fibrosis mutation (delta F508) does not influence the chloride channel activity of CFTR, *Nat. Genet.* 3 (1993) 311–316.
- [14] M. Sharma, M. Benharouga, W. Hu, G.L. Lukacs, Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 8942–8950.
- [15] R.C. Rubenstein, P.L. Zeitlin, A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157 (1998) 484–490.
- [16] G.M. Denning, M.P. Anderson, J.F. Amara, J. Marshall, A.E. Smith, M.J. Welsh, Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive, *Nature* 358 (1992) 761–764.
- [17] S. Sato, C.L. Ward, M.E. Krouse, J.J. Wine, R.R. Kopito, Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 635–638.
- [18] B. Illek, H. Fischer, G.F. Santos, J.H. Widdicombe, T.E. Machen, W.W. Reenstra, cAMP-independent activation of CFTR Cl channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) C886–C893.
- [19] M.E. Egan, J. Glockner-Pagel, C. Ambrose, P.A. Cahill, L. Pappoe, N. Balamuth, E. Cho, S. Canny, C.A. Wagner, J. Geibel, M.J. Caplan, Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells, *Nat. Med.* 8 (2002) 485–492.
- [20] J. Lytton, M. Westlin, M.R. Hanley, Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 17067–17071.
- [21] E. Cornet-Boyaka, A. Di, S.Y. Chang, A.P. Naren, A. Tousson, D.J. Nelson, K.L. Kirk, CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 12477–12482.
- [22] V. Raghuram, D.D. Mak, J.K. Foscett, Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 1300–1305.
- [23] D.B. Short, K.W. Trotter, D. Reczek, S.M. Kreda, A. Bretscher, R.C. Boucher, M.J. Stutts, S.L. Milgram, An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 19797–19801.
- [24] S. Wang, H. Yue, R.B. Derin, W.B. Guggino, M. Li, Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity, *Cell* 103 (2000) 169–179.
- [25] J. Cheng, B.D. Moyer, M. Milewski, J. Loffing, M. Ikeda, J.E. Mickle, G.R. Cutting, M. Li, B.A. Stanton, W.B. Guggino, A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 3520–3529.
- [26] P. Trouvé, M.A. Le Drévo, M. Kerbirou, G. Friocourt, Y. Fichou, D. Gillet, C. Férec, Annexin V is directly involved in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's function, *BBA—Molecular Basis of Disease, Biochim. Biophys. Acta* 1772 (2007) 1121–1133.
- [27] M.J. Crumpton, J.R. Dedman, Protein terminology tangle, *Nature* 345 (1990) 212.
- [28] N.W. Ikebuchi, D.M. Waisman, Calcium-dependent regulation of actin filament bundling by lipocortin-85, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 3392–3400.
- [29] T. Funakoshi, R.L. Heimark, L.E. Hendrickson, B.A. McMullen, K. Fujikawa, Human placental anticoagulant protein: isolation and characterization, *Biochemistry* 26 (1987) 5572–5578.
- [30] J.P. Mira, T. Dubois, J.P. Oudinet, S. Lukowski, F. Russo-Marie, B. Geny, Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin V in differentiated permeabilized HL-60 cells. Evidence of crucial importance of domain I type II Ca²⁺-binding site in the mechanism of inhibition, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10474–10482.
- [31] E. Camors, D. Charue, P. Trouvé, V. Monceau, X. Loyer, F. Russo-Marie, D. Charlemagne, Association of annexin A5 with Na⁺/Ca²⁺-exchanger and caveolin-3 in non-failing and failing human heart, *J. Mol. Cell Cardiol.* 40 (2006) 47–55.
- [32] S. Mukhopadhyay, W. Cho, Interactions of annexin V with phospholipid monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1279 (1996) 58–62.
- [33] H.B. Pollard, E. Rojas, Ca²⁺-activated synexin forms highly selective, voltage-gated Ca²⁺ channels in phosphatidylserine bilayer membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1988) 2974–2978.
- [34] O. Lambert, N. Cavusoglu, J. Gally, M. Vincent, J.L. Rigaud, J.P. Henry, J. Ayala-Sanmartin, Novel organization and properties of annexin 2-membrane complexes, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 10872–10882.
- [35] C. Norez, F. Antigny, F. Becq, C. Vandebrouck, Maintaining low Ca²⁺-level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells, *Traffic* 7 (2006) 562–573.
- [36] A. Hakansson, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, H. Sabharwal, C. Svanborg, Apoptosis induced by a human milk protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 8064–8068.
- [37] A.L. Cozens, M.J. Yessi, K. Kunzelmann, T. Ohnui, L. Chin, K. Eng, W.E. Finkbeiner, J.H. Widdicombe, D.C. Gruenert, CFTR expression and Chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10 (1994) 38–47.
- [38] E. Bruscia, F. Sangiuolo, K.K. Goncz, G. Novelli, D.C. Gruenert, Isolation of CF cell lines corrected at ΔF508-CFTR locus by SFHR-mediated targeting, *Gene Ther.* 9 (2002) 683–685.
- [39] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [40] V. Leblais, S. Demolombe, G. Vallette, D. Langin, I. Baro, D. Escande, C. Gauthier, β₃-adrenoreceptor control the CFTR conductance through a cAMP/PKA-independent pathway, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6107–6113.
- [41] M. Kerbirou, M.A. Le Drévo, C. Férec, P. Trouvé, Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: differential role of Grp78 and ATF6, *Biochim. Biophys. Acta* 1772 (2007) 1236–1249.
- [42] J.P. Pennec, H. Talarmin, M. Droguet, M.A. Giroux-Metges, M. Gioux, G. Dorange, Characterization of the voltage-activated currents in cultured atrial myocytes isolated from the heart of the common oyster *Crassostrea gigas*, *J. Exp. Biol.* 207 (2004) 3935–3944.
- [43] L.S. Prince, R.B. Workman, R.B. Marchase, Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 5192–5196.
- [44] M. Ramjeeasingh, J.F. Kidd, L.J. Huan, Y. Wang, C.E. Bear, Dimeric cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exists in the plasma membrane, *Biochem. J.* 374 (2003) 793–797.
- [45] N. Bensalem, A.P. Ventura, B. Vallee, J. Lipecka, D. Tondelier, N. Davezac, S.A. Dos, M. Perretti, A. Fajac, I. Sermet-Gaudelus, M. Renouil, J.F. Lesure, F. Halgand, O. Laprevote, A. Edelman, Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients, *Mol. Cell Proteomics* 4 (2005) 1591–1601.
- [46] L.A. Borthwick, J. McGaw, G. Conner, C.J. Taylor, V. Gerke, A. Mehta, L. Robson and R. Muimo, The formation of the cAMP/PKA-dependent Annexin 2-S100A10 complex with CFTR regulates CFTR channel function, *Mol. Cell. Biol.* (Ahead of print).
- [47] G.B. Della Gaspera, S. Weinman, C. Huber, M. Lemnaouar, A. Paul, J. Picard, D.C. Gruenert, Overexpression of annexin V in cystic fibrosis epithelial cells from fetal trachea, *Exp. Cell Res.* 219 (1995) 379–383.
- [48] B. Stringer, A. Imrich, L. Kobzik, Lung epithelial cell A549 interaction with unopsonized environmental particulates: quantitation of particle-specific binding and IL-8 production, *Exp. Lung Res.* 22 (1996) 495–508.
- [49] V. Gerke, S.E. Moss, Annexins and membrane dynamics, *Biochim. Biophys. Acta* 1357 (1997) 129–154.
- [50] C.E. Creutz, The annexins and exocytosis, *Science* 258 (1992) 924–931.
- [51] F.M. Megli, M. Selvaggi, S. Liemann, E. Quagliariello, R. Huber, The calcium-dependent binding of annexin V to phospholipid vesicles influences the bilayer inner fluidity gradient, *Biochemistry* 37 (1998) 10540–10546.
- [52] G. Jung, D.M. Andrews, K.L. Carraway, C.A. Carraway, Actin-associated cell-surface glycoprotein from ascites cell microvilli: a disulfide-linked multimer, *J. Cell Biochem.* 28 (1985) 243–252.
- [53] I. Giambanco, G. Pula, R. Bianchi, R. Donato, Interaction of two brain annexins, CaBP33 and CaBP37, with membrane-skeleton proteins, *FEBS Lett.* 267 (1990) 171–175.

3. Mise en place du projet de recherche

Bien que cela fut longuement discuté, des études récentes démontrent une nouvelle fois l'expression du canal CFTR dans la membrane apicale de cellules épithéliales (nasales et bronchiques) issues de patients homozygotes pour la mutation F508del (Borthwick *et al.*, 2011, van Meegen *et al.*, 2013). Certains auteurs précisent néanmoins qu'il y serait présent en plus faible quantité du fait de sa stabilité réduite (Borthwick *et al.*, 2011). La mise en place du contrôle de qualité des protéines à la membrane plasmique pourra conduire à la reconnaissance de ces protéines mutées et à leur adressage vers la voie de dégradation lysosomale, limitant ainsi leur temps de résidence dans la membrane apicale.

Considérant les différentes propriétés décrites pour l'AnxA5, nous proposons, à l'issue des travaux exposés précédemment, que cette protéine régule l'expression du CFTR (wt et F508del) inséré dans la membrane plasmique en y améliorant sa présence (Le Drévo *et al.*, 2008). Impactant positivement la stabilité du CFTR à la surface cellulaire, l'interaction CFTR-AnxA5 influencerait *in fine* les sécrétions ioniques médiées par le canal CFTR.

L'AnxA5 apparaît donc comme une cible potentielle pour la correction de certains défauts engendrés par la mutation F508del. Une approche thérapeutique pourrait être l'identification de molécules capables d'élever son expression dans des cellules épithéliales exprimant le mutant F508del de la protéine CFTR, sans en affecter leur survie. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de recherche. D'après certaines données de la littérature, la *gonadotropin-releasing hormone* ou GnRH, une molécule utilisée en thérapeutique humaine depuis plus de 25 ans, se présente comme un candidat potentiel.

4. La GnRH, un candidat potentiel pour augmenter l'expression de l'AnxA5 ?

Plusieurs travaux font état d'un lien entre l'activation de la (des) voie(s) de signalisation associée(s) au R_GNRH et une augmentation de l'expression de l'AnxA5 (ARNm et/ou protéine). Au vu de certaines propriétés présentées par l'AnxA5 (pouvoir inhibant sur les phospholipases et la PKC), l'équipe de T. Tanaka rapporte une possible implication de cette annexine dans l'effet anti-prolifératif de l'agoniste Buséréline (Shibata *et al.*, 1997). Un traitement de la lignée cellulaire humaine HHUA (dérivée de cancer de l'endomètre) avec l'agoniste à 10^{-5} mol/l (M) conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire de l'AnxA5. Un pic est observé 48 heures après le début de la stimulation. Selon les auteurs, la synthèse protéique d'AnxA5 serait promue par l'activation de la PKC, laquelle fait suite à la liaison de la Buséréline sur le R_GNRH (Shibata *et al.*, 1997). L'utilisation d'activateurs et d'inhibiteurs de la PKC a permis de renforcer l'implication de cette kinase dans l'effet observé (Shibata *et al.*, 1997). Une relation similaire est également décrite dans des cultures primaires de léiomyomes utérins humains (effet de l'agoniste GnRH observé au niveau de la concentration intracellulaire de l'AnxA5 et des transcrits) (Yamamoto *et al.*, 2001).

La GnRH est aussi connue pour stimuler l'expression de l'AnxA5 dans les cellules gonadotropes, comme en témoignent plusieurs travaux conduits par Kawaminami et collaborateurs. L'étude initiatrice date de 1998 et montre, chez la ratte, que l'expression de l'AnxA5 (transcrit et protéine) dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure est significativement augmentée trois semaines après une ovariectomie (Kawaminami *et al.*, 1998). Les auteurs préciseront plus tard que cette stimulation de la synthèse est liée à une élévation de la production de la GnRH (absence de rétrocontrôle négatif par les stéroïdes sexuels) (Kawaminami *et al.*, 2002a). La même année, travaillant sur des cultures primaires de cellules d'hypophyse antérieure de rat, ils rapportent que l'expression de l'AnxA5 est directement contrôlée par la liaison de l'agoniste de la GnRH sur son récepteur, conduisant à l'activation de la PKC. La quantité de transcrits du gène *AnxA5* (transcrits *AnxA5*) est augmentée dès une heure d'incubation avec l'agoniste, utilisé entre 10^{-7} M et 10^{-8} M. Cette élévation est maintenue pendant les 5 heures de traitement. Par ailleurs, les auteurs observent des effets similaires avec l'utilisation d'un activateur de la PKC, le TPA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*), mais pas avec un activateur de l'AC, la Fsk (Kawaminami *et al.*, 2002b). L'influence de la GnRH sur la synthèse de l'AnxA5 a également été rapportée dans les ovaires de rattes, plus précisément dans les cellules lutéales (Kawaminami *et al.*, 2003), et dans les testicules de rats, au niveau des cellules de Leydig (Yao et Kawaminami, 2008).

La grande majorité des études mentionnées ci-dessus s'est particulièrement intéressée à la modulation de la synthèse de l'AnxA5 par la GnRH dans les gonadotropes et certaines cellules du tractus génital. Il semblerait que dans ces modèles, l'AnxA5 participe à la transduction du signal associé au RGnRH (en tant que molécule de signalisation), affectant *in fine* la synthèse et la sécrétion des gonadotropines, comme la LH, ou encore la stéroïdogenèse. Il a aussi été suggéré que dans les cellules gonadotropes, l'activation des MAPKs de type ERK, et en particulier ERK1/2, participait à la régulation de l'expression du gène codant l'AnxA5 (Kawaminami *et al.*, 2008).

Un travail très intéressant mené par Kakar et collaborateurs met en lumière les multiples effets transcriptionnels engendrés par l'activation du RGnRH dans la lignée cellulaire gonadotrope de souris L β T2. Ces dernières ont été stimulées par un agoniste de la GnRH à 100 nM pendant 1 et 24 heures, à la suite desquelles les ARN ont été extraits et préparés afin d'être hybridés sur une puce à ADN Affymetrix arborant près de 12400 sondes. Cette étude révèle que sur les 12400 gènes, près de 450 (soit ~ 3.6 %) présentent des altérations de leur expression après une heure de traitement avec l'agoniste, dont 164 avec un *fold change* (FC) supérieur à 2 (pour revue : Kakar *et al.*, 2004). Des gènes codant des facteurs de transcription et des protéines engagées dans des fonctions biologiques diverses telles que la communication et la signalisation cellulaire, le transport, la croissance cellulaire, le métabolisme ou encore l'apoptose, ont ainsi été identifiés. En cohérence avec les travaux cités précédemment, le gène codant l'AnxA5 montre une expression modifiée suite au traitement avec l'agoniste [FC < 2 (1 heure), FC ~ 3-4 (24 heures)]. Quelques gènes mis en exergue suite à l'étude sur puce à ADN ont également été validés par RT-PCR. Cette technique confirme l'augmentation des niveaux d'ARNm codant l'AnxA5 suite à une heure de traitement avec l'agoniste (~ + 4, par rapport

aux témoins négatifs). Par ailleurs, à la différence de nombreux gènes testés, l'élévation des transcrits *AnxA5* se maintient dans le temps : 24 heures après le début de l'incubation, des niveaux d'ARNm équivalents à environ sept fois ceux retrouvés dans des cellules non stimulées sont encore observés (Kakar *et al.*, 2003).

Partie 2. Objectifs et déroulement de l'étude

Considérant les différents travaux cités ci-dessus, la GnRH se présente donc comme une piste intéressante à explorer. Trois questions essentielles ont initialement été posées : i) le RGnRH est-il retrouvé dans nos différents modèles d'étude ?, ii) la GnRH permet-elle de moduler positivement l'expression de l'*AnxA5* dans des cellules épithéliales issues des voies aériennes humaines (ce qui n'a jamais été étudié jusqu'à ce jour) ? et iii) si oui, cette augmentation impacte-t-elle les courants médiés par le canal CFTR et sa présence dans la membrane plasmique (comme cela a été observé lors des approches de surexpression avec le plasmide pcDNA3.1/*AnxA5*) ?

Dans un premier temps, il a fallu nous assurer que les modèles d'étude choisis présentaient bien une expression du RGnRH, nécessaire à la mise en place de la cascade de signalisation intracellulaire. Devant les résultats obtenus, l'étude s'est poursuivie par l'évaluation de la modulation de l'expression de l'*AnxA5* suite au traitement de nos modèles cellulaires avec la GnRH, plus particulièrement au niveau protéique.

Suite aux observations faites pendant la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés, dans un deuxième temps, à l'effet de la GnRH sur les sécrétions ioniques dépendantes du canal CFTR et sa présence à la surface cellulaire. Ces expérimentations ont été conduites dans les lignées exprimant le CFTR muté F508del ainsi que dans celles exprimant le CFTR-wt.

Les différents résultats obtenus au cours de cette étude seront présentés et discutés dans le prochain chapitre de ce manuscrit. Ils font l'objet d'un article actuellement en révision dans le journal *Plos One* (PONE-D-13-36018).

RÉSULTATS

Article 2. Stimulation de cellules épithéliales bronchiques humaines par la GnRH : conséquences sur l'expression de l'AnxA5 et sur le transport ionique médié par la protéine CFTR

Avant-propos

La perte du résidu F508del va engendrer de nombreuses conséquences sur la protéine CFTR, lesquelles sont observées dès sa biosynthèse jusqu'à son comportement dans la membrane plasmique. Ces différentes anomalies sous-entendent le développement de plusieurs stratégies correctrices, dans le but de renverser efficacement le phénotype des patients homozygotes pour cette mutation.

La protéine AnxA5 interagit directement avec NBD1. De plus, surexprimée, elle est capable d'améliorer significativement la présence du canal CFTR (wt et F508del) dans la membrane plasmique des cellules. Cette annexine apparaît donc être impliquée dans la modulation des sécrétions ioniques dépendantes du canal CFTR, probablement en favorisant sa stabilité à la surface cellulaire (Trouvé *et al.*, 2007, Le Drévo *et al.*, 2008). Ainsi, dans une optique d'application thérapeutique, une piste potentielle pourrait être l'identification de molécules capables d'augmenter l'expression intracellulaire de l'AnxA5. D'après certaines données de la littérature, la GnRH se présente comme une molécule candidate. Il a été choisi de la tester dans des cellules exprimant le mutant F508del de la protéine CFTR.

Débutée avec les lignées A549 (CFTR-wt et CFTR-F508del), l'étude s'est ensuite focalisée sur les lignées 16HBE14o- et CFBE41o-. Ces dernières expriment respectivement la version sauvage et la version mutée F508del du CFTR de manière endogène et sont couramment utilisées par les équipes de recherche travaillant sur la mucoviscidose. Dans un souci d'homogénéité génétique et de niveau d'expression de la protéine CFTR, les lignées CFBE41o-/wt et CFBE41o-/F508del ont également été intégrées au projet.

Résumé des résultats

Ce travail a été initié par l'évaluation de l'expression du RGnRH dans nos différents modèles d'étude. Les techniques de RT-PCR et de Western blot nous ont permis de nous assurer de sa présence dans les lignées exprimant le CFTR-wt ainsi que celles exprimant le CFTR-F508del. L'expression basale de l'AnxA5, au niveau messager et protéique, a également été explorée, nous permettant de valider l'utilisation des quatre lignées cellulaires : 16HBE14o-, CFBE41o-, CFBE41o-/wt et CFBE41o-/F508del.

Afin d'évaluer l'impact d'une stimulation par la GnRH sur les niveaux intracellulaires de l'AnxA5, des cinétiques d'expression ont été mises en place dans nos différents modèles d'étude. Les cellules ont été incubées avec la GnRH à une concentration de 10^{-9} M pendant 30, 60, 120, 180 et

310 minutes. Une augmentation significative de l'expression intracellulaire de l'AnxA5 (protéine) a été observée après 60 minutes d'incubation avec l'hormone, pour tous les types cellulaires. Cette élévation, maintenue à un taux relativement stable pendant les 5 heures de traitement, rejoint ainsi les observations faites par Kawaminami et collaborateurs (Kawaminami *et al.*, 2002b).

Les investigations se sont poursuivies en étudiant l'effet d'une stimulation par la GnRH sur les sécrétions ioniques dépendantes du CFTR. Pour cela, la technique des efflux d'iodure fut mise en œuvre grâce à une collaboration avec le Professeur Frédéric Becq et le Docteur Caroline Norez du Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM) à Poitiers. Une hausse significative de la sortie active des ions I⁻ a été observée pour les cellules traitées avec la GnRH, comparativement aux cellules non stimulées. Cet impact sur le transport ionique médié par le CFTR a été montré dans les lignées exprimant la version mutée F508del de la protéine ainsi que dans celles en exprimant la version sauvage. Les techniques de biotinylation et d'immunocytochimie ont permis de corréler cette élévation de la sécrétion des ions I⁻ à une augmentation de la quantité de canaux CFTR insérés dans la membrane plasmique.

Conclusion et discussion

A l'issue de ces travaux, nous pouvons donc apporter une réponse précise à deux des trois questions posées au début de l'étude : i) le RGnRH est exprimé dans des lignées cellulaires épithéliales issues des voies aériennes humaines, non dérivées de tumeurs et ii) une stimulation d'une heure par la GnRH à 1 nM conduit à une augmentation de l'expression intracellulaire de l'AnxA5, dans des cellules non-CF et CF.

Concernant le troisième axe de l'étude, nous montrons qu'un traitement avec la GnRH entraîne une augmentation de l'expression du canal CFTR (wt et F508del) à la surface cellulaire, laquelle aboutit à une élévation des sécrétions ioniques dépendantes du CFTR. Néanmoins, au vu de la multitude de voies de signalisation susceptibles d'être activées et de gènes pouvant être régulés suite à la liaison de la GnRH sur son récepteur, il est probable que l'augmentation de l'expression de l'AnxA5 ne soit pas le seul événement moléculaire responsable de l'effet bénéfique observé.

Improvement of chloride transport defect by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cystic fibrosis epithelial cells

Benz N^{a,b}, Le Hir S^{a,c}, Norez C^d, Kerbirou M^{a,e}, Calvez ML^{a,e}, Becq F^d, Trouvé P^{a,*}
and Férec C^{a,c,e,f,*}

Short title: **GnRH improves chloride transport in CF cells**

^a Inserm, UMR 1078, Brest, F-29218, France ;

^b Association Gaétan Saleün, Brest, F-29218, France ;

^c C.H.R.U. Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Brest, F-29200, France ;

^d Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS FRE 3511, Université de Poitiers, Poitiers, F-86022, France ;

^e Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine et des sciences de la santé, Brest, F-29200, France;

^f Établissement Français du Sang - Bretagne, Brest, F-29200, France.

*Corresponding authors: Pascal Trouvé (pascal.trouve@univ-brest.fr)

Claude Férec (claud.ferec@univ-brest.fr)

INSERM-UMR 1078

46, rue Félix le Dantec, CS 51819

29218 Brest Cedex 2

Tel: 33.(0)2.98.22.36.79

Fax: 33.(0)2.98.01.83.42

Abstract

Cystic fibrosis (CF), the most common autosomal recessive disease in Caucasians, is due to mutations in the CFTR gene. F508del, the most frequent mutation in patients, impairs CFTR protein folding and biosynthesis. The F508del-CFTR protein is retained in the endoplasmic reticulum (ER) and its traffic to the plasma membrane is altered. Nevertheless, if it reaches the cell surface, it exhibits a Cl⁻ channel function despite a short half-life. Pharmacological treatments may target the F508del-CFTR defect directly by binding to the mutant protein or indirectly by altering cellular proteostasis, and promote its plasma membrane targeting and stability. We previously showed that annexin A5 (AnxA5) directly binds to F508del-CFTR and, when overexpressed, promotes its membrane stability, leading to the restoration of some Cl⁻ channel function in cells. Because Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) increases AnxA5 expression in some cells, we tested it in CF cells. We showed that human epithelial cells express GnRH-receptors (GnRH-R) and that GnRH induces an AnxA5 overexpression and an increased Cl⁻ channel function in F508del-CFTR cells, due to an increased stability of the protein in the membranes.

Beside the numerous physiological implications of the GnRH-R expression in epithelial cells, we propose that a topical use of GnRH is a potential treatment in CF.

Keywords: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; Gonadotropin-Releasing Hormone; Annexin A5

Abbreviations: Gonadotropin-Releasing Hormone, GnRH; Cystic Fibrosis, CF; annexin A5, AnxA5; Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disease in Caucasians. It is caused by mutations in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein [1]. CFTR which is a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, functions as an ion channel [1, 2]. It is mostly expressed in the apical membrane of epithelial cells and helps to maintain the fluid and electrolyte balance across the cell membrane. CFTR comprises two membrane-spanning domains (MSDs), two nucleotide-binding domains (NBDs) and a regulatory domain (RD). The CFTR protein undergoes a complex biosynthetic pathway in the endoplasmic reticulum (ER) in which molecular chaperones and co-chaperones are involved [3]. Wild-type CFTR (Wt-CFTR) biogenesis initiates in the ER where the protein is core-glycosylated, leading to an immature precursor form known as band B (~145 KDa). It further undergoes maturation and glycosylation through the Golgi, originating a complex mature form (band C, ~170-kDa) (4). Only 25% to 70% of the precursor Wt-CFTR matures, depending on the cell type [5]. The remaining part undergoes ubiquitination and degradation by the proteasomal pathway [6, 7]. In membranes, once phosphorylated by protein kinase A (PKA) in the R domain, CFTR functions as an ATP-gated chloride (Cl⁻) channel [8].

Among the 1940 described mutations in the CFTR gene (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>), the deletion of phenylalanine at position 508 (F508del) is the most common one, associated with ~70% of CF alleles [9]. The F508del mutation causes a protein folding defect, the nascent protein being retained in the ER. As a result, most of the F508del-CFTR channels are degraded intracellularly and very little is targeted to the plasma membrane [10-13]. Nevertheless, in the plasma membrane it exhibits a Cl⁻ channel activity despite an open probability 15 times lower than that of Wt-CFTR [14-16]. Furthermore, the F508del-CFTR protein has a faster turnover at the cell surface than Wt-CFTR [17].

In order to overcome the F508del-CFTR defects and provide a potential treatment for CF, potentiators aimed to correct the channel's activity and correctors of the F508del-CFTR trafficking defect have been developed. Potentiators that increase the mutated CFTR's channel activity when it is phosphorylated function via direct binding to modulate the NBDs dimerization or to increase ATP binding and hydrolysis [18-20]. Correctors may act indirectly or by a direct binding to F508del-CFTR. Indirect correctors such as 4-phenylbutyrate [21], glycerol [22], low temperature [23] and miglustat [24] act upon folding, ER retention, degradation and F508del-CFTR trafficking. To date, only few correctors that act specifically on F508del-CFTR by a direct binding and called pharmacological chaperones, are reported. These are VRT325, Corr4a, VRT532 and benzo[c]quinolizinium compounds [25-27]. Among potential proteins that bind to CFTR, we demonstrated that annexin A5 (AnxA5) binds directly to Wt- and F508del-CFTR when the channel is in the plasma membrane of cells. Indeed, we showed that AnxA5 is associated with the NBD1 of CFTR and using a siRNA and overexpression approach, we showed that CFTR's channel function and membrane localization were dependent on AnxA5 expression [28].

Because our previous results showed that raised AnxA5 expression induced an augmented function of F508del-CFTR due to increased membrane localization [29], the aim of the present study was to highlight a mean to increase AnxA5 expression in F508del-CFTR expressing cells, using a drug with no side effect upon cell survival. Because it was previously showed that AnxA5 is synthesized in gonadotropes and in various cell types under the effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or some of its analogs, through mitogen activated protein kinase (MAPK), we tested the hypothesis that GnRH could increase AnxA5 expression in a human epithelial cell line and subsequently induce an increased F508del-CFTR function [30-32]. Using PCR, western blottings and iodide effluxes experiments, we show here that human epithelial cells express GnRH- receptors (GnRH-R) and that GnRH induces an AnxA5 overexpression and subsequently an increased Cl⁻ channel function of F508del-CFTR, likely due to an increased localization of the protein in membranes.

In conclusion, we show here that human epithelial cells do express GnRH-R, which has numerous physiological implications. We also propose that a topical use of GnRH is a potential treatment for CF.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The 16HBE14o⁻ and the CFBE41o⁻ airway epithelial cell lines were obtained from D.C. Gruenert [33, 34]. Cell culture media and supplements were purchased from Lonza (Basel, Switzerland) and PAA (Pasching, Austria). The transduced CFBE41o⁻ cell lines (CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del) used in experiments were cultured as described previously [35, 36]. Cells were treated with 10⁻⁹ M synthetic GnRH ([Gly-OH10]-LH-RH) from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) for 30, 60, 120, 180 and 310 min.

2.2. Transfection

For GnRH-R overexpression and inhibition, cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, with either the human cDNA clone pCMV6-XL5/GNHR-R (OriGene Technologies Inc., Rockville, MD, USA) or the human GnRH-R siRNA (siGENOME individual duplex, 5'-GGAAUUUGGUAUUGGUUUG-3') (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The scrambled control siRNA was siGENOME Non-Targeting (Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.3. RNA Extraction and quantitative Real-Time PCR

Quantitative Real-Time PCR was performed to assess the basal GnRH-R and AnxA5 mRNA expression in cells and to study their modulation after GnRH treatment. Cultured medium was removed and cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). RNA was extracted using RNeasy Plus mini kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Extracted RNA was eluted in RNase-free water and the concentration was determined

using a nano-photometer (Implen GmbH, München, Germany). Relative quantification of the transcripts was assessed in a two steps format (RT and qPCR). Real-Time PCR was performed using a QuantiTect® SYBR® Green PCR kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions. A Chromo 4™ System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) was used to amplify cDNAs and detect emitted fluorescence. The following primers were used: GnRH-R (319pb), forward 5'-GACCTTGTCTGGAAAGATCC-3' and reverse 5'-CAGGCTGATCACCACCATCA-3'; AnxA5 (149pb), forward 5'-TTCTCAGAGGCACTGTGACTGACT-3' and reverse 5'-GATTTCCTGGCGCTGAGCATTACT-3'; G3PDH (121pb), forward 5'-CCCATGTTCGTCATGGGTGTGAAC-3' and reverse 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACCTTGGC-3'. Reactions were carried out with the following parameters: enzyme activation at 95°C for 15 min, denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 57°C for 30 sec, extension at 72°C for 30 sec and a final extension at 72°C for 10 min. 30 and 35 cycles were used for AnxA5 and GnRH-R, respectively. For negative controls (NTC), cDNA was replaced by sterile RNase free water. Poly-A⁺ mRNA from human breast adenocarcinoma (MCF 7 cells) and Poly-A⁺ mRNA from human pituitary gland (both from Clontech, Member of Takara Bio Inc., Shigan, Japan) were used as positive controls.

2.4. Protein extraction and Western blot analysis

Untreated cells and GnRH treated cells were washed twice with cold PBS and were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Na-Deoxycholate, 0.1 % SDS, 10 mM iodoacetamide, 100 µM PMSF; pH 7.5) in the presence of Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Total protein concentrations were determined using Lowry's methodology using bovine serum albumin as a standard [37]. Samples were resolved by SDS-PAGE (7.5 to 10 %) and transferred onto a PVDF membrane (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). After blotting, membranes were blocked with 5 % (w/v) non-fat dried skimmed milk in PBS-0.1 % Tween 20 or TBST (Tris-buffered saline plus 0.1 % Tween 20). Blots were probed overnight at 4°C with mouse monoclonal antibody anti-GnRH-R (1:150, LH-RH Receptor Ab-3, clone GNRH03, MM France, Francheville, France) or goat polyclonal antibody anti-AnxA5 (1:400, clone R-20, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Blots were further incubated with HRP-conjugated secondary antibodies [1:20000, anti-mouse and anti-goat secondary antibody were from Santa Cruz Biotechnology and Abcam (Cambridge, UK), respectively] and visualized by enhanced chemiluminescence. ECL Plus and Forte chemiluminescence detection kits were from GE Healthcare and Merk Millipore (Billerica, MA, USA), respectively. The relative intensity of each band was estimated by densitometry using BIO-1D software (BioRad). Each value was normalized to the amount of G3PDH in the same lane which was assessed on the same immunoblots probed with mouse monoclonal antibody anti-G3PDH (1:30000, clone 6C5, Interchim SA, Montluçon, France). Positive controls for GnRH-R and AnxA5 were a whole cell lysates of human breast duct carcinoma (T-47D, Tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, France) and pure AnxA5 from human placenta (33KD, Sigma-Aldrich), respectively.

2.5. Iodide effluxes experiments

Cells were cultured in 24-well microplates for 3 to 7 days. Confluent monolayers were used, and iodide effluxes were assayed as previously described [38]. Briefly, the F508del-CFTR Cl^- channel activity was assayed by measuring the rate of iodide (^{125}I) efflux from cells and time-dependent rates of ^{125}I efflux were calculated from the following: $\ln (^{125}\text{I } t_1 / ^{125}\text{I } t_2) / (t_1 - t_2)$, where ^{125}I is the intracellular ^{125}I at time t , and t_1 and t_2 successive time points. Curves were constructed by plotting rates of ^{125}I versus time. All comparisons were based on maximal values for the time-dependent rates ($k = \text{peak rates, min}^{-1}$), excluding the points used to establish the baseline ($k_{\text{peak}} - k_{\text{basal, min}^{-1}}$). Activators were included in the efflux buffer from time 3 min, and collection continued at 1-min intervals for an additional 7 min in the continued presence of tested compounds (for other details, [38]). To test the effect of GnRH exposure on halide permeability, CF and non-CF cells monolayers were incubated with 0.1 to 100 nM GnRH for 1 h before the efflux experiment.

2.6. Cell surface biotinylation

Cells were grown in serum-free medium overnight before GnRH incubation. Culture medium was then removed and cells were washed three times with PBS plus 0.1 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2 (pH 7.4) and once with PBS (pH 8). Cells were exposed to sulfo-NHS-SS-biotin for 30 min on ice, rinsed twice with BSA quenching buffer (1 % BSA in PBS, pH 7.4) and incubated 10 min in the same buffer. Cells were scraped in PBS, pH 7.4 and centrifuged at 2400 rpm (6 min, 4°C). Cell pellets were suspended in RIPA buffer plus anti-proteases and incubated for 30 min on ice. The resulting lysates were centrifuged at 16000 g for 15 min at 4°C and total cellular protein content was determined using Lowry's method. The supernatants were incubated with streptavidin beads (Novagen/EMD Chemicals, Madison, WI, USA) overnight at 4°C. After a brief centrifugation, supernatants were removed and the beads were washed four times in RIPA. Biotinylated proteins were eluted from streptavidin beads using 5X sample buffer containing 2-mercaptoethanol to cleave the NHS-SS-biotin and western blots were probed overnight at 4°C with a mouse monoclonal anti-CFTR antibody (1:500, clone M3A7, Merk Millipore). For normalization, Na^+/K^+ -ATPase expression was assessed on the same blots probed with a mouse monoclonal antibody (1:200, clone 9-A5, Santa Cruz Biotechnology). A positive control was used to assess the mature band of CFTR (T84, human colorectal carcinoma whole cell lysate).

2.7. Confocal microscopy

CFBE41o $^-$ /Wt and CFBE41o $^-$ /F508del cells were plated on 18-mm diameter glass coverslips at low density and maintained in culture at 37°C for 24 to 48 h before exposure to GnRH. Cells were rinsed in TBS, fixed (3 % paraformaldehyde in TBS, 20 min, room temperature), rinsed in TBS, permeabilized (0.10 % Triton X-100 in TBS) and rinsed again. The samples were then stained by indirect immunofluorescence. After fixation, non-specific sites were blocked with 0.5 % bovine serum albumin (BSA) in TBS (60 min at room temperature). The cells were then stained with primary antibody (anti-CFTR antibody 24-1, 1:50, RD Systems, Minneapolis, MN, USA) for 90 min at room temperature and rinsed four times in TBS containing 0.5 % BSA. Next, samples were incubated with

the goat anti-mouse secondary antibody conjugated to Cy3 (1:400, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) for 60 min at room temperature. After final washes, samples were mounted in VectaShield plus DAPI (VECTOR Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), dried, and viewed with a confocal laser-scanning microscope (LSM 780, Axio Observer, Plan-Apochromat 63X/1.40 oil; Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany). Negative controls in which primary antibody was omitted was performed.

2.8. Statistics

Results are expressed as the means $\pm$ S.E.M of n observations. Data were compared using the Student's t test analysis with STATGRAPHICS version 4.1 (SIGMA PLUS, Levallois-Perret, France) and differences were considered statistically significant when $p < 0.001$ (***); $p < 0.01$ (**) and $p < 0.05$ (*).

3. Results

3.1. Basal expression of GnRH-R

Basal mRNA and protein expression of GnRH-R was assessed in 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻, CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells. As shown in Fig.1A, a single PCR band for GnRH-R (319 bp) was observed in the four cell lines whereas no signal was observed in the negative control. cDNAs from human pituitary gland and human MCF7 cell line (breast adenocarcinoma) were used as positive controls. The mRNA expression of G3PDH (121 bp) in the same samples showed no variation of the signal intensity. The mRNA expression of GnRH-R was quantified (Fig.1B). Because the genetic background is only comparable between CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells, statistical analysis was only performed for these cells and a higher mRNA expression was observed in CFBE41o⁻/F508del cells. Western blots were performed to detect GnRH-R (64 kDa) and G3PDH (37 kDa) in the cell lines (Fig.1 C), using a whole cell lysate of human breast duct carcinoma (T -47D) as a control. The results indicate that the GnRH-R is present in all the samples. The densitometric analysis of the signals (Fig.1 D) did not show any difference between CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells.

To assess the GnRH-R antibody's specificity, the GnRH-R's expression was modulated before immunodetection. First, 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻ cells were transfected with a GnRH-R expression vector in which the cDNA encoding GnRH-R was ligated. As shown in Fig. 2A, the immunoblots indicated that the transfection induced an increased expression of the receptor. The control cells were transfected with the empty vector and G3PDH was detected for further normalization. The quantitative analysis of the blots (Fig. 2B) showed that the transfection of the expression vector induced an increased expression of GnRH-R of 70% and 44% in 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻ cells, respectively, when compared to the control cells. Second, a siRNA directed against GnRH-R was used and a decreased expression of the protein was observed in both cell types (Fig. 2C). The quantitative analysis of the blots (Fig. 2D) showed that the siRNA induced a decrease expression of GnRH-R of 64% and 65% in

16HBE14o⁻, CFBE41o⁻ cells, respectively, when compared to the control cells which were transfected with a scrambled siRNA.

3.2. Basal expression of AnxA5

Basal mRNA and protein expression of AnxA5 was assessed in 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻, CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells. As shown in Fig. 3A, AnxA5 mRNA (149 bp) was detected in all cell lines whereas, no signal was observed in the negative control. The gene expression of AnxA5 was quantified in cells using Real-Time PCR. Analysis of the data (Fig. 3B) between CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells showed a higher expression in the cells expressing the mutated CFTR. AnxA5 expression was further assessed by western blottings (Fig. 3C). The statistical analysis (Fig. 3D) indicated that AnxA5 expression does not vary within cell lines. Nevertheless, the amount of AnxA5 protein tended to be higher in CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells than in 16HBE14o⁻ or CFBE41o⁻ cells.

3.3. AnxA5 expression in cells submitted to GnRH treatment for 60 min.

In order to determine whether GnRH modulates AnxA5 expression and to determine the shortest time to be used for GnRH treatment, 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻, CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells were treated with 10⁻⁹ M GnRH for 30, 60, 120, 180 and 310 min (not shown). At each time point, the protein expression of AnxA5 was evaluated and normalized with that of G3PDH. The AnxA5 expression was compared to that of cells incubated with buffer alone used as a control. Fig. 4A shows an example of the obtained western blots at the 60 min time point. An increased intensity of the AnxA5 band was observed in all cell types. Densitometry of the bands, normalization using G3PDH and quantification were performed (Fig. 4B). It was concluded that a 60 min treatment led to a significant increase of AnxA5 expression in the four cell types.

3.4. Increased endogenous F508del-CFTR's function by GnRH treatment

To test the activity of CFTR channels under GnRH treatment in 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻, CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells, functional analysis was performed by measuring the cAMP regulated and CFTR-dependent iodide efflux after 1 h incubation at 37° C with GnRH (10⁻⁹ M). The activity of CFTR was stimulated by a mixture of adenylate cyclase activator forskolin (Fsk, 10 μM) plus isoflavone genistein (Gst, 30 μM) or inhibited by the thiazolidinone specific CFTR blocker CFTRinh-172 (10 μM). Example of mean traces showing an increased iodide efflux in 16HBE14o⁻ cells, untreated or treated with GnRH is shown in Fig. 5A. This example shows that after adding Fsk/Gst, the rate of iodide efflux increased at a maximum rate (peak value) after 4 min and that the peak was higher in the presence of GnRH. Experiments were conducted for all cell types and the results are represented as bar graphs in Fig. 5B. Statistical analysis indicated that in the presence of GnRH, the rates of iodide efflux were significantly increased in 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻, CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells when compared to untreated cells, indicating that CFTR and F508del-CFTR's function are increased by GnRH. The concentration-response effect of GnRH was

further determined in the presence or absence of Fsk and Gst (Fig. 6). Calculated an EC₅₀ in 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻, CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells were 0.6±1.4 nM, 0.8±1.2 nM, 0.9±1.3 nM and 2.2±1.4 nM, respectively.

3.5. Increased membrane expression of CFTR after GnRH treatment

The presence of CFTR within membranes after 1 hour treatment by GnRH was assessed by biotinylation experiments. Cells were biotinylated with Sulfo-NHS-SS-biotin, pulled-down with streptavidin-agarose and subjected to 7.5% SDS-PAGE. Total cell lysates were used as inputs. Representative immunoblots showing the detection of CFTR in biotinylated surface proteins from 16HBE14o⁻ and CFBE41o⁻/Wt cells are shown in Fig. 7A and 7B, respectively. CFTR was present in total lysates and in pulled down samples. The densitometric analysis of CFTR's cell surface expression was performed and normalized with the biotinylated Na⁺/K⁺-ATPase level. The statistical analysis clearly indicates that the amount of biotinylated CFTR is higher after GnRH treated cells (Fig. 7C). An increased amount of CFTR in membranes of 33 and 36 % was observed in 16HBE14o⁻ and CFBE41o⁻/Wt cells, respectively. Whereas CFTR was detected in inputs, we failed to detect it in biotinylated surface proteins from CFBE41o⁻ and CFBE41o⁻/F508del cells (not shown).

3.6. Increased membrane localization of CFTR after GnRH treatment

Because we failed to detect CFTR in CFBE41o⁻ and CFBE41o⁻/F508del cells due to the poor expression of the protein, membrane localization of CFTR in CFBE41o⁻/F508del cells was assessed by confocal microscopy, in the absence (Fig. 8A) and in the presence (Fig. 8B) of a GnRH treatment (120 min). Without any treatment, CFTR was mainly observed around the nuclei of the cells, likely in the ER. When cell were treated with GnRH, CFTR had a more spread localization and it was observed in the plasma membrane of the cells, as shown in Fig. 8B by white arrows. Controls performed without CFTR antibody showed no labelling (not shown).

3.7. Comparison of the effect of miglustat and GnRH

The time-dependent effects of miglustat and GnRH were assessed and compared in CFBE41o⁻ and CFBE41o⁻/F508del cells (Fig. 9). CFTR's function was assessed by the iodide effluxes technique in the presence of 1 nM GnRH or 100 μM miglustat. As shown in Fig. 9A, miglustat induced an increased iodide efflux in CFBE41o⁻ cells after 1 hour treatment. The increase was higher at the 2 hours time point. GnRH also induced an increased iodide efflux but the effect was lower, but significant, and did not increase after 2 hours of treatment. In CFBE41o⁻/F508del cells (Fig. 9B), the same time-dependent effect as in CFBE41o⁻ cells was observed.

4. Discussion

The most common mutation causing CF, F508del-CFTR, is known for more than 20 years [1]. The F508del-CFTR nascent protein is recognized by the cellular quality control machinery and is degraded. A very small amount succeeds in trafficking to the cell membrane where it functions as a Cl⁻ channel. Many efforts were performed in order to identify molecules that could correct the trafficking defect. Indeed, it is estimated that the required correction to ameliorate the symptoms in CF patients is between 10% and 30% of wild-type CFTR function [39, 40].

Among proteins that directly bind to CFTR, we previously showed that AnxA5 binds to NBD1 and, when over expressed, may restore some Cl⁻ channel function due to an increased stabilization of CFTR in membranes [28, 29]. AnxA5 belongs to the annexin family which is characterized by calcium-dependent phospholipid binding. Annexins are found in a wide variety of species, from plants to human [41-43]. They are known to inhibit PLA2, PKC, and blood coagulation [41]. Under specific conditions, AnxA5 can also form a calcium channel [44]. Despite these molecular characteristics, their physiological role within cells remains unclear.

Whereas the CFTR-AnxA5 interaction as well as the augmented Wt-CFTR whole-cell currents, due to over-expression of AnxA5, was further confirmed, it was not seen in F508del-CFTR expressing cells [45]. The given explanation for this discrepancy with our previous results and within the referred study is likely due to the different cell systems that were used. These authors suspect that AnxA5 does not interact specifically with CFTR. This discrepancy is likely due to the use of a non specific AnxA5 antibody [45]. Because it is suggested that some CFTR is expressed at the apical membrane in epithelial cells from CF patients [46], despite a reduced level when compared to non-CF cells, and because we found a positive effect of AnxA5, our aim was to highlight a non toxic mean to increase AnxA5 expression in F508del-CFTR expressing cells. Some previous results clearly demonstrate that GnRH stimulation induces the expression of AnxA5 in the gonadotropes, luteal cells and other cell types [30-32]. Therefore, we tested the hypothesis of an AnxA5 increased synthesis in response to GnRH stimulation in human epithelial cells of the airways.

GnRH is secreted by GnRH neurons in the hypothalamus and is transported to the gonadotropes of the anterior pituitary gland. It is a decapeptide involved in the control of reproduction and binds to a specific G protein-coupled receptor to allow gonadotropin secretion. GnRH and its receptor are reported to be expressed in human tissues outside of the hypothalamus, such as liver, heart, skeletal muscle and kidney where its functions are unclear [47].

The first step of the present work was to assess the expression of GnRH-R and AnxA5 in human epithelial cells (Fig. 1 to 3). 16HBE14 o⁻, CFBE41o⁻ and the transduced CFBE41o⁻ airway epithelial cell lines CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del were used [35]. Using PCR and western blottings, we observed an AnxA5 and GnRH-R expression in these cells. Because the genetic background of 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻ cells are different, their GnRH-R expression was not compared. The GnRH-R expression (protein) did not vary between CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells. Because anti-GnRH-R antibodies are debated, we decided to assure us of the results. For this, GnRH-R expression was modulated (increased and decreased) before immunodetection and we showed that

the observed band was indeed GnRH-R. The GnRH-R expression in airway epithelial cells is in accordance with previous results showing its expression in extrapituitary tissues. A high expression level of the mRNA was found in prostate, thymus, and kidney. In heart, brain, placenta, lung, liver, skeletal muscle, pancreas, colon, ovary, small intestine, spleen, and testis the mRNA was also detected [48]. The presence and localization of GnRH-R in airway epithelial cells (Calu-3) was also shown using immunochemical methods [49]. Here, we present for the first time the GnRH-R expression in 16HBE14 o⁻, CFBE41o⁻ and the transduced CFBE41o⁻ airway epithelial cell lines, using immunoblots. AnxA5 expression was studied in our cell models at the mRNA and protein level and we found that it is also expressed. This result is in accordance with previous results [50]. Therefore, GnRH-R and AnxA5 expression being shown, further experiments were conducted.

The second step of the work was to study AnxA5 expression under GnRH treatment and the effect of the hormone on the function of CFTR (Fig. 4 to 6). The four cell types were treated with GnRH (10^{-9} M) for 30, 60, 120, 180 and 310 min (not shown) and western-blottings were performed. A significant increased AnxA5 expression was observed at the 60 min time point and remained stable until 310 min. This increased expression of AnxA5 under GnRH treatment was previously described. Indeed, a continuous exposure to GnRH driving a specific gene expression of AnxA5 without desensitization was reported [32]. Nevertheless, our further experiments were conducted at 60 min of GnRH treatment, corresponding to a significant increased AnxA5 expression in 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻, CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells. Functional analysis was performed by measuring the CFTR-dependent iodide efflux in the absence and in the presence of GnRH. Statistical analysis indicated that with GnRH, the rates of iodide efflux were significantly increased in 16HBE14o⁻, CFBE41o⁻, CFBE41o⁻/Wt and CFBE41o⁻/F508del cells when compared to untreated cells. EC₅₀ were relatively low (2.2 nM in CFBE41o⁻/F508del cells).

Our third step was to give some potential explanations to the observed increased Cl⁻ channel function of CFTR in the presence of GnRH. We assessed a possible increased anchoring of CFTR within membranes by biotinylation and confocal microscopy (Fig. 7, 8). According to our previous work [28, 29], we found that the presence of F508del-CFTR was increased in membranes. Due to the pleiotropic effects of GnRH, we hypothesize that the increased AnxA5 expression is likely not the only reason for this effect. Indeed, the expression of AnxA5 is directly stimulated by GnRH, probably through protein kinase C, MAKP and calcium pathways which are also involved in the regulation and in the targeting of CFTR in membranes [30-32, 38, 51-53]. The involved pathways explaining the increased membrane localization of F508del-CFTR when cells are stimulated by GnRH, as well as the involvement of calcium are under investigation in our laboratory. Interestingly, the rapid and sustained action of GnRH seems different of the action of correctors or potentiators. We found of interest to compare the action of the well known corrector miglustat [24] with that of GnRH (Fig. 9). Time dependant effects of miglustat and GnRH were different. Whereas, miglustat induced a continuous increased iodide efflux until 2 hours, the GnRH effect observed at the 1 hour time point remained stable until the 2 hours. This observation permit to say that actions are likely different and reinforce the hypothesis that GnRH does not act as a corrector. Miglustat permits F508del-CFTR to escape the ER whereas GnRH maintains it in membranes. The association of both miglustat and GnRH will be further

explored in primary cultures.

In conclusion, we show here for the first time that GnRH-R are expressed in the used airway epithelial cells at the protein level and we propose that GnRH restores some Cl⁻ channel function in CF cells. Because some GnRH analogs such as leuprolide, buserelin and goserelin are already used in medical practice as nasal sprays, we intend to test these medications in human primary cells. Nevertheless, due to some side effects, we believe that their use would be restrained to short treatments, under medical supervision.

Acknowledgements

We thank the association Gaétan Saleün, the SFR Scinbios (Brest) and the French foundation “Vaincre la Mucoviscidose” for their financial support.

Disclosure

All authors declare that they have no conflict of interest, and that they have no financial interest in the information contained in the present manuscript.

References

- [1] Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073
- [2] Bear, C.E., Li, C.H., Kartner, N., Bridges, R.J., Jensen, T.J., Ramjeeasingh, M., Riordan, J.R. (1992) Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* **68**, 809-818
- [3] Amaral MD (2004) Cftr and chaperones: Processing and degradation. *J MolNeurosci* **23**, 41-48
- [4] Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O'Riordan, C.R., Smith, A.E. (1990) Defective intracellular transport and processing of cftr is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63**, 827-834
- [5] Lukacs, G.L., Mohamed, A., Kartner, N., Chang, X.B., Riordan, J.R., Grinstein, S. (1994) Conformational maturation of cftr but not its mutant counterpart (delta f508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires atp. *EMBO J* **13**, 6076-6086
- [6] Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D.B., Goldberg, A.L., Riordan, J.R. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to cftr processing. *Cell* **83**, 129-135
- [7] Ward, C.L., Omura, S., Kopito, R.R. (1995) Degradation of cftr by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121-127
- [8] Hwang, T.C., Sheppard, D.N. (2009) Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J Physiol* **587**, 2151-2161
- [9] Zielenski, J., Tsui, L.C. (1995) Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* **29**, 777-807
- [10] Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O'Riordan, C.R., Smith, A.E. (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63**, 827-834
- [11] Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E., Welsh, M.J. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761-764
- [12] Sato, S., Ward, C.L., Krouse, M.E., Wine, J.J., Kopito, R.R. (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* **271**, 635-638
- [13] Welsh, M.J., Denning, G.M., Ostedgaard, L.S., and Anderson, M.P. (1993). Dysfunction of CFTR bearing the delta F508 mutation. *J.Cell Sci. Suppl.* **17**, 235-239

- [14] Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R.G., Pavirani, A., Lecocq, J.P., Lazdunski, M. (1991) Altered chloride ion channel kinetics associated with the $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation. *Nature* **354**, 526-528
- [15] Ostedgaard, L.S., Rogers, C.S., Dong, Q., Randak, C.O., Vermeer, D.W., Rokhlina, T., Karp, P.H., Welsh, M.J. (2007) Processing and function of CFTR- $\Delta F508$ are species-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 15370-15375
- [16] Miki, H., Zhou, Z., Li, M., Hwang, T.C., Bompadre, S.G. (2010) Potentiation of disease-associated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutants by hydrolyzable ATP analogs. *J Biol Chem* **285**, 19967-19975
- [17] Lukacs, G.L., Chang, X.B., Bear, C., Kartner, N., Mohamed, A., Riordan, J.R., Grinstein, S. (1993). The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 21592-21598
- [18] Hwang, T.C., Wang, F., Yang, I.C., Reenstra, W.W. (1997) Genistein potentiates wild-type and delta F508-CFTR channel activity. *Am. J. Physiol.* **273**, C988-C998
- [19] Cai, Z., Sheppard, D.N. (2002) Phloxadine B interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple sites to modulate channel activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 19546-19553
- [20] Vergani, P., Lockless, S.W., Nairn, A.C., Gadsby, D.C. (2005) CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* **433**, 876-880
- [21] Rubenstein, R.C., Egan, M.E., Zeitlin, P.L. (1997) In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J. Clin. Invest.* **100**, 2457-2465
- [22] Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q., Biwersi, J., Verkman, A.S., Welch, W.J. (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* **1**, 117-125
- [23] Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E., Welsh, M.J. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761-764
- [24] Norez, C., Noel, S., Wilke, M., Bijvelds, M., Jorna, H., Melin, P., DeJonge, H., Becq, F. (2006) Rescue of functional $\Delta F508$ -CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the α -glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett.* **580**, 2081-2086
- [25] Wang, Y., Bartlett, M.C., Loo, T.W., Clarke, D.M. (2006) Specific rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing mutants using pharmacological chaperones. *Mol. Pharmacol.* **70**, 297302

- [26] Wang, Y., Loo, T.W., Bartlett, M.C., Clarke, D.M. (2007) Correctors promote maturation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by binding to the protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 33247-33251
- [27] Becq, F., Mettey, Y., Gray, M.A., Galietta, L.J., Dormer, R.L., Merten, M., Metaye, T., Chappe, V., Marvingt-Mounir, C., Zegarra-Moran, O., et al. (1999) Development of substituted Benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel. *J. Biol. Chem.* **274**, 27415-27425
- [28] Trouvé, P., Le Drévo, M.A., Kerbiriou, M., Fichou, Y., Gillet, D., Férec, C. (2007) Annexin V is directly involved in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's chloride channel function. *Biochim Biophys Acta.* **1772**, 1121-33
- [29] Le Drévo, M.A., Benz, N., Kerbiriou, M., Gioux, M., Pennec, J.P., Trouvé, P., Férec, C. (2008) Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the $\Delta F508$ -Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 605-614
- [30] Kawaminami, M., Etoh, S., Miyaoka, H., Sakai, M., Nishida, M., Kurusu, S., Hashimoto, I. (2002) Annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in pituitary gonadotropes is induced by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and modulates GnRH stimulation of gonadotropin release. *Neuroendocrinology* **75(1)**, 2-11
- [31] Yao, B., Kawaminami, M. (2008) Stimulation of annexin A5 expression by gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the Leydig cells of rats. *J Reprod Dev* **54(4)**, 259-64
- [32] Kawaminami, M., Uematsu, N., Funahashi, K., Kokubun, R., Kurusu, S. (2008) Gonadotropin releasing hormone (GnRH) enhances annexin A5 mRNA expression through mitogen activated protein kinase (MAPK) in LbetaT2 pituitary gonadotrope cells. *Endocr J.* **55(6)**, 1005-14
- [33] Cozens AL, Yessi MJ, Kunzelmann K, Ohri T, Chin L, et al. (1994) CFTR expression and Chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **10**, 38-47.
- [34] Bruscia, E., Sangiuolo, F., Sinibaldi, P., Goncz, K. K., Novelli, G., Gruenert, D. C. (2002) Isolation of CF cell lines corrected at DeltaF508-CFTR locus by SFHR-mediated targeting. *Gene Ther.* **9**, 683-685
- [35] Illek, B., Maurisse, R., Wahler, L., Kunzelmann, K., Fischer, H., Gruenert, D. C. (2008) Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates with CFTR mRNA expression levels. *Cell. Physiol. Biochem.* **22**, 57-68
- [36] Bebok, Z., Collawn, J. F., Wakefield, J., Parker, W., Li, Y., Varga, K., Sorscher, E. J., Clancy, J. P. (2005) Failure of cAMP agonists to activate rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o- airway epithelial monolayers. *J. Physiol.* **569**, 601-615

- [37] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- [38] Norez, C., Antigny, F., Becq, F., Vandebrouck, C. (2006) Maintaining Low Ca²⁺ Level in the Endoplasmic Reticulum Restores Abnormal Endogenous F508del-CFTR Trafficking in Airway Epithelial Cells. *Traffic* **7**, 562-573
- [39] McKone, E.F., Emerson, S.S., Edwards, K.L., and Aitken, M.L. (2003) Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* **361**, 1671-1676.
- [40] Zhang, L., Button, B., Gabriel, S.E., Burkett, S., Yan, Y., Skiadopoulos, M.H., Dang, Y.L., Vogel, L.N., McKay, T., Mengos, A., et al. (2009) CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS Biol.* **7**, e1000155
- [41] Gerke, V., Moss, S.E. (2002) Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82**, 331-371
- [42] Crompton, M.R., Moss, S.E., Crumpton, M.J. (1988) Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell* **55**, 1-3
- [43] Moss, S.E., Morgan, R.O. (2004) The annexins. *Genome Biol* **5**, 219
- [44] Rojas, E., Pollard, H.B., Haigler, H.T., Parra, C., Burns, A.L. (1990) Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. *J Biol Chem* **265**, 21207-21215
- [45] Faria, D., Dahimène, S., Alessio, L., Scott-Ward, T., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Amaral, M.D. (2011) Effect of Annexin A5 on CFTR: regulated traffic or scaffolding? *Mol Membr Biol.* **28(1)**, 14-29
- [46] Borthwick, L.A., Botha P., Verdon, B., Brodlie, M.J., Gardner, A., Bourn, D., Johnson, G.E., Gray, M.A., Fisher, A.J. (2011) Is CFTR-delF508 really absent from the apical membrane of the airway epithelium? *PLoS One* **6(8)**, e23226
- [47] Kakar, S.S., Jennes, L. (1995) Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor mRNAs in various non-reproductive human tissues. *Cancer Lett.* **27;98(1)**, 57-62
- [48] Tieva, A., Stattin, P., Wikström, P., Bergh, A., Damber, J.E. (2001) Gonadotropin-releasing hormone receptor expression in the human prostate. *Prostate* **47(4)**, 276-84
- [49] Koushik, K., Bandi, N., Sundaram, S., Kompella, U.B. (2004) Evidence for LHRH-Receptor Expression in Human Airway Epithelial (Calu-3) Cells and Its Role in the Transport of a LHRH Agonist. *Pharmaceutical Research* **21(6)**, 1034-1046(13)
- [50] Reutelingsperger, C.P., van Heerde, W., Hauptmann, R., Maassen, C., van Gool, R.G., de Leeuw, P., Tiebosch, A. (1994) Differential tissue expression of Annexin VIII in human. *FEBS Lett.* **349(1)**, 120-4

- [51] Kawaminami, M., Tsuchiyama, Y., Saito, S., Katayama, M., Kurusu, S., Hashimoto, I. (2002) Gonadotropin-releasing hormone stimulates annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in the anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **291(4)**, 915-20
- [52] Alzamora, R., King, J.D.Jr, Hallows, K.R. (2011) CFTR regulation by phosphorylation. *Methods Mol Biol.* **741**, 471-88
- [53] Baudouin-Legros, M., Hinzpeter, A., Jaulmes, A., Brouillard, F., Costes, B., Fanen, P., Edelman, A. (2005) Cell-specific posttranscriptional regulation of CFTR gene expression via influence of MAPK cascades on 3'UTR part of transcripts. *Am J Physiol Cell Physiol* **289(5)**, C1240-50

Legends to the figures

Figure 1. Basal mRNA and protein expression of GnRH-R.

A. The upper left panel shows representative PCR bands for GnRH-R (319 bp) after separation (2% agarose gel). A single band is observed in 16HBE14o⁻ (lane 1), CFBE41o⁻ (lane 2), CFBE41o⁻/Wt (lane 3) and CFBE41o⁻/F508del (lane 4) cells. No signal is observed in the negative control (lane 5). The upper right panel shows positive controls (lanes 1 and 2) for the detection of GnRH-R. cDNAs were from the human pituitary gland and the human MCF7 cell line (breast adenocarcinoma), respectively. The mRNA expression of G3PDH (121 bp) is shown lower panel for the same samples. MW is the molecular weight given in base pairs (bp). **B.** The quantitative analysis (n=5) of the mRNA of GnRH-R. Ct is the Cycle Threshold. A high Ct correspond to low mRNA abundance because more PCR cycles are needed to detect it. Endogenous control has a lower Ct than the target mRNA. Therefore, a low ΔCt (= Ct gene – Ct control) correspond to high mRNA abundance. **C.** Upper panel shows representative immunoblots of GnRH-R (64 kDa) and lower panel shows representative immunoblots of G3PDH (37 kDa). A protein expression is observed in 16HBE14o⁻ (lane 1), CFBE41o⁻ (lane 2), CFBE41o⁻/Wt (lane 3) and CFBE41o⁻/F508del (lane 4) cells. A positive control (lane 5) was used for the detection of GnRH-R (human breast duct carcinoma (T-47D) whole cell lysate). G3PDH was used for further normalization. **D.** The densitometric analysis of GnRH-R expression (n=6) did not show any difference between cell lines.

Figure 2. Validation of the detection of GnRH-R in immunoblots.

A. Representative immunoblots of GnRH-R detection (upper panel) after 48 h transfection with the Human cDNA clone pCMV6-XL5/GNRH-R in 16HBE14o⁻ (1) and CFBE41o⁻ (2) cells. pCMV6-XL5 empty plasmid was used as a control. **B.** The densitometric analysis after normalization by G3PDH expression and comparison with the controls, indicate that the GnRH-R expression is significantly increased in 16HBE14o⁻ (1) and CFBE41o⁻ (2) cells (n=5) in the presence of the plasmid pCMV6-XL5/GNRH-R. **C.** Representative immunoblots of GnRH-R detection after 72 h transfection with a siGENOME individual duplex targeting GnRH-R in 16HBE14o⁻ (1) and CFBE41o⁻ (2) cells. siGENOME Non-Targeting was used as control. A decreased expression of GnRH-R is observed in both cell types. **D.** The densitometric analysis after normalization by G3PDH expression and comparison with the controls, indicate that the GnRH-R expression is significantly decreased in 16HBE14o⁻ (1) and CFBE41o⁻ (2) cells (n=7) in the presence of siRNA.

Figure 3. Basal mRNA and protein expression of AnxA5.

A. The left image shows representative PCR bands for AnxA5 (149 bp) and the right image shows representative PCR bands for G3PDH (121 bp, 2% agarose gel). A single band is observed in 16HBE14o⁻ (lane 1), CFBE41o⁻ (lane 2), CFBE41o⁻/Wt (lane 3) and CFBE41o⁻/F508del (lane 4) cells. No signal is observed in the negative control (lane 5). MW is the molecular weight given in base pairs (bp). **B.** The gene expression of AnxA5 was determined by quantitative Real-Time PCR in each cell line and data were analyzed by using ΔCt (target – reference). Comparison between CFBE41o⁻/Wt (3)

and CFBE410⁻/F508del (4) cells show a higher expression in CF cells. **C.** The upper image shows a representative immunodetection of AnxA5 protein (35 kDa) and the lower image shows the immunodetection of G3PDH (37 kDa) protein expression in 16HBE140⁻ (lane 1), CFBE410⁻ (lane 2), CFBE410⁻/Wt (lane 3) and CFBE410⁻/F508del (lane 4) cells. Pure AnxA5 was used as a positive control (lane 5). G3PDH was detected to show that the loading was identical in each lane and for further normalization. **D.** Statistical analysis of AnxA5 expression (n=6) indicate that the expression of AnxA5 does not vary among cell lines although it tends to be higher in CFBE410⁻/Wt (3) and CFBE410⁻/F508del (4) cells than in 16HBE140⁻ (1) or CFBE410⁻ (2) cells.

Figure 4. AnxA5 expression when cells are treated for 60 min with GnRH.

A. Representative immunoblots showing AnxA5 and G3PDH expression in 16HBE140⁻ (1), CFBE410⁻ (2), CFBE410⁻/Wt (3) and CFBE410⁻/F508del (4) cells after 60 min of treatment by GnRH (10⁻⁹M). An increased expression is observed in all cell types. **B.** Densitometric analysis of AnxA5 expression. Data are normalized by G3PDH. AnxA5 protein expression is presented as mean ± S.E.M (7 independent experiments with n ≥ 2 for each experiment). For each cell line, the statistical analysis was performed by comparing the normalized amount of AnxA5 between cells incubated with buffer alone (black bars adjusted to 1) and cells incubated with GnRH (white bars).

Figure 5. Activation of wild-type and F508del-CFTR chloride channel activity in cells treated by GnRH. **A.** Example of iodide efflux curves for 16HBE140⁻ cells untreated or treated 1 h with 1 nM GnRH and stimulated by 10 μM forskolin and 30 μM genistein. **B.** Bar graph showing the enhancement of the chloride channel function of CFTR in 16HBE140⁻, CFBE410⁻, CFBE410⁻/Wt and CFBE410⁻/F508del cells (1, 2, 3 and 4, respectively) using iodide effluxes experiments. Histograms show the mean relative rate of iodide efflux in each cell type, with and without GnRH treatment. A significant increase is observed in the presence of GnRH (n=4).

Figure 6. Concentration-dependent effect of GnRH. Concentration-dependent enhancement of CFTR's function by GnRH in 16HBE140⁻ (A), CFBE410⁻ (B), CFBE410⁻/Wt (C) and CFBE410⁻/F508del (D): CFTR activity was assessed with the iodide effluxes technique in the presence of forskoline (10 μM) plus genistein (30 μM) after 1h of incubation. Results are expressed as normalized means (± SEM, n=4).

Figure 7. Membrane expression of CFTR after GnRH treatment. The presence of CFTR within membranes was detected by biotinylation experiments. **A.** Representative immunoblots showing the detection of CFTR in biotinylated surface proteins from 16HBE140⁻ cells. CFTR is present in total proteins (left) and in biotinylated surface proteins (right) after GnRH treatment (10⁻⁹M) for 60 min. The arrowheads indicate the fully glycosylated (180 kDa) CFTR. **B.** Same image as in A. with CFBE410⁻/Wt cells. **C.** Histograms of the densitometric analysis of CFTR's cell surface expression (n=4) in 16HBE140⁻ (1) and CFBE410⁻/Wt (2) cells. The biotinylated CFTR level is normalized to the biotinylated Na⁺/K⁺-ATPase level. Cells incubated with buffer alone are referred as 1 arbitrary unit.

Figure 8. Immunolocalization of CFTR in CFBE41o-/F508del cells after GnRH treatment.

A. Representative confocal photomicrographs of the localization of F508del-CFTR in cells without any treatment. CFTR is mostly observed around the nuclei, likely in the endoplasmic reticulum.

B. Representative confocal photomicrographs of the localization of F508del-CFTR in cells after GnRH treatment. CFTR is observed in the endoplasmic reticulum but also in membranes.

Figure 9. Comparison of the effect of miglustat and GnRH. Comparison of the time-dependent effect of GnRH or miglustat upon F508del-CFTR function in CFBE41o- cells (**A**) and in CFBE41o-/F508del cells (**B**). CFTR activity was assessed with the iodide effluxes technique in the presence of forskolin (10 μ M) plus genistein (30 μ M) after 1 nM GnRH or 100 μ M miglustat incubation (n= 4).

Figure 1

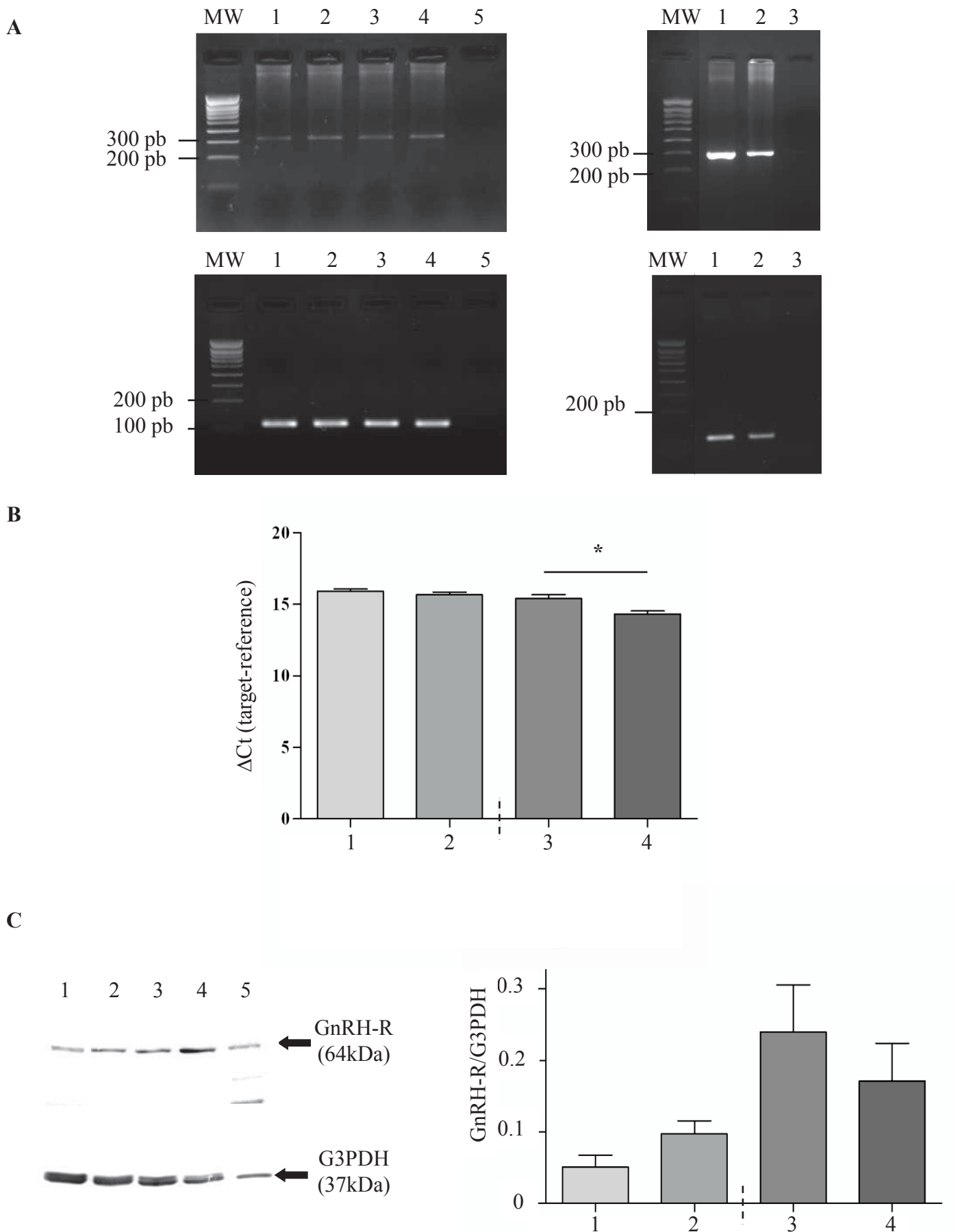


Figure 2

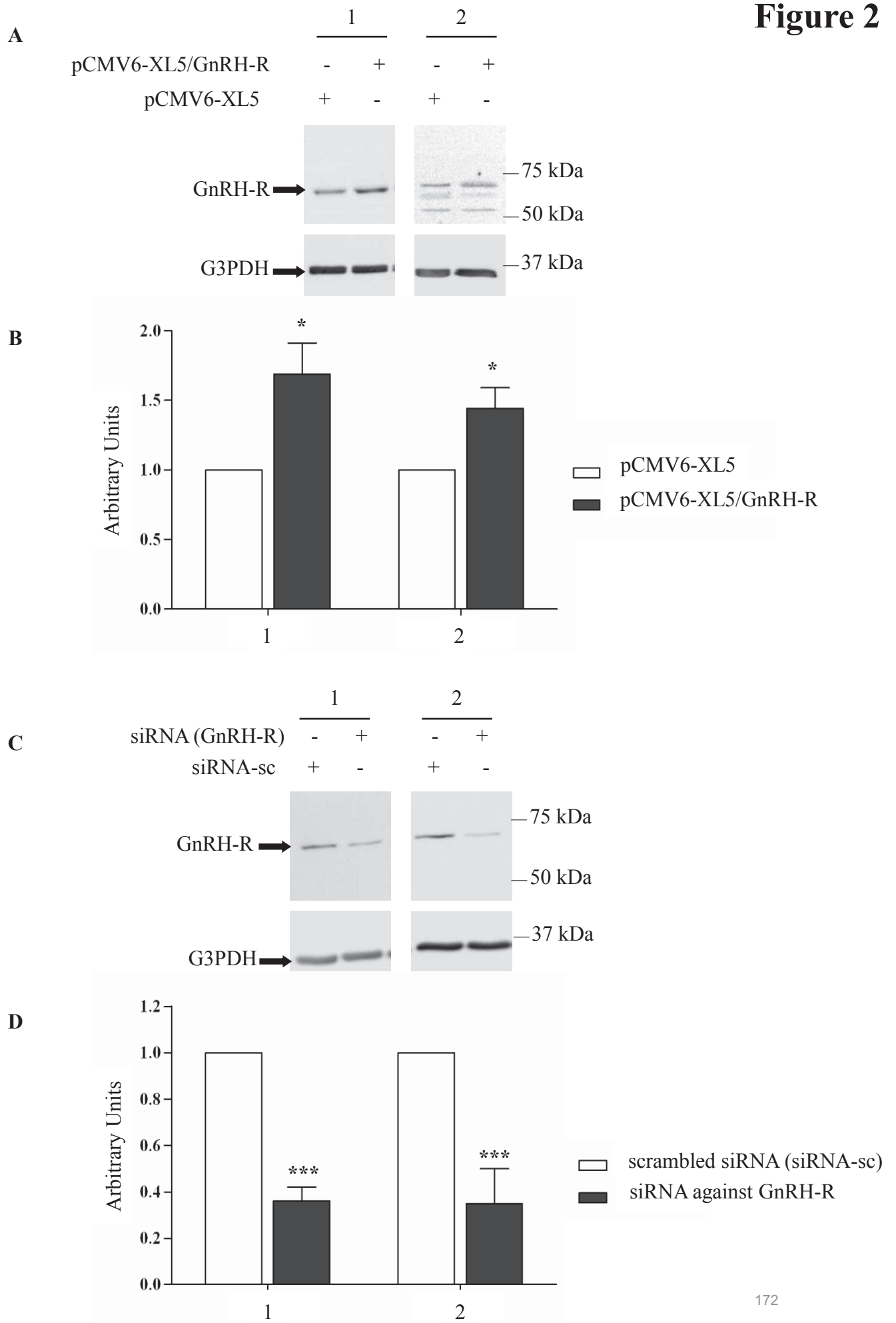


Figure 3

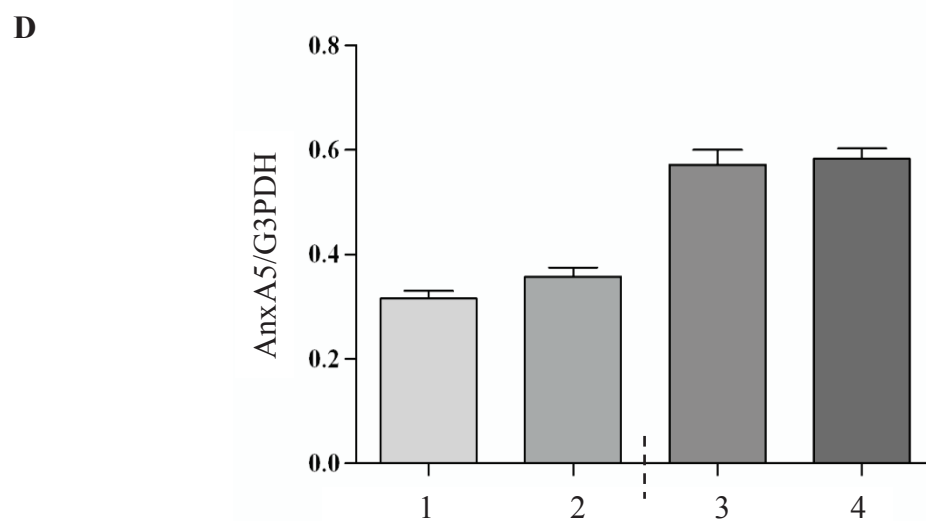
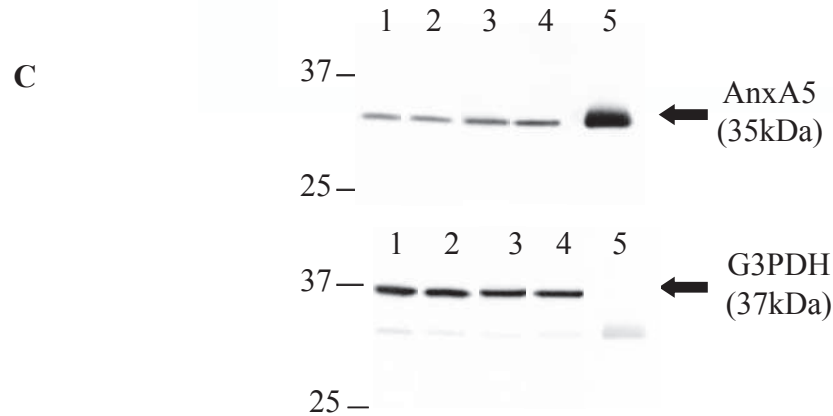
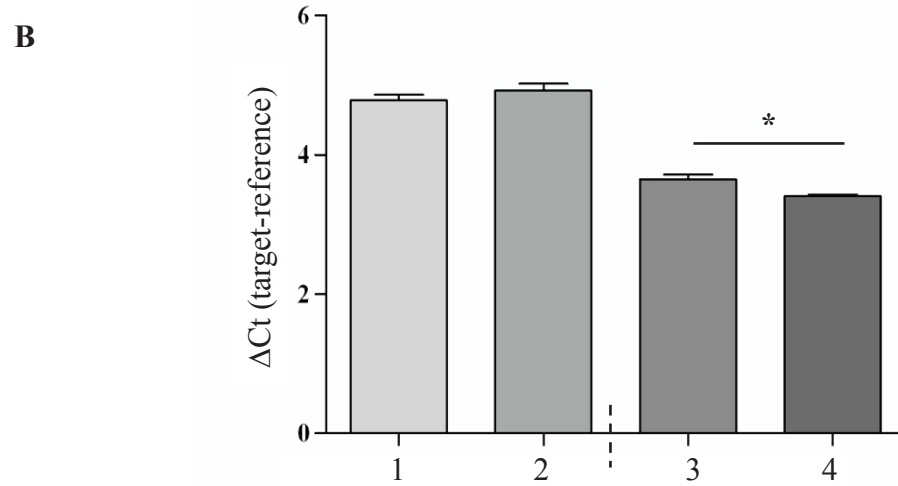
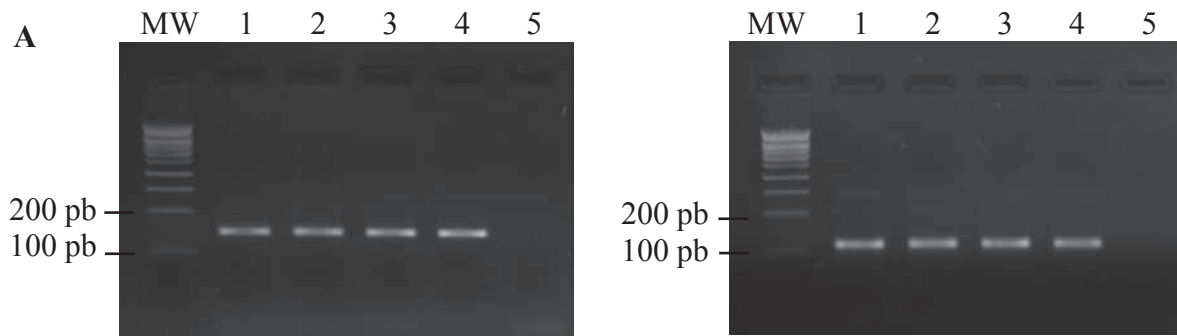
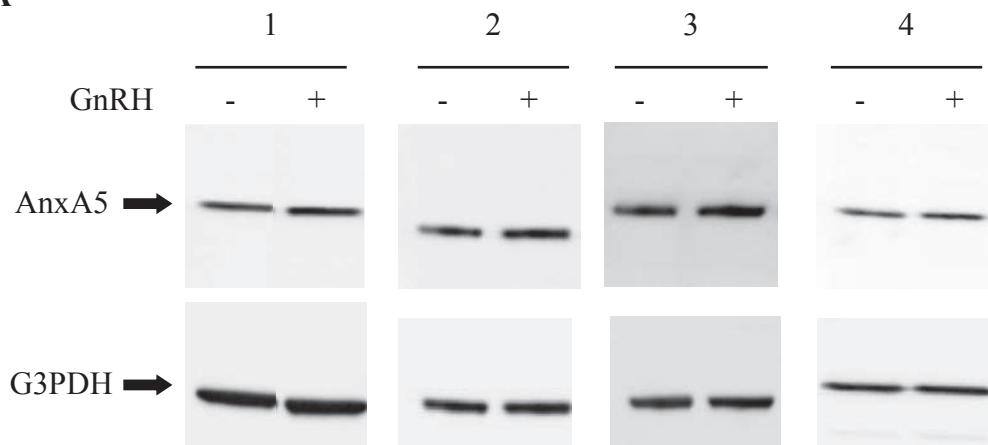


Figure 4

A



B

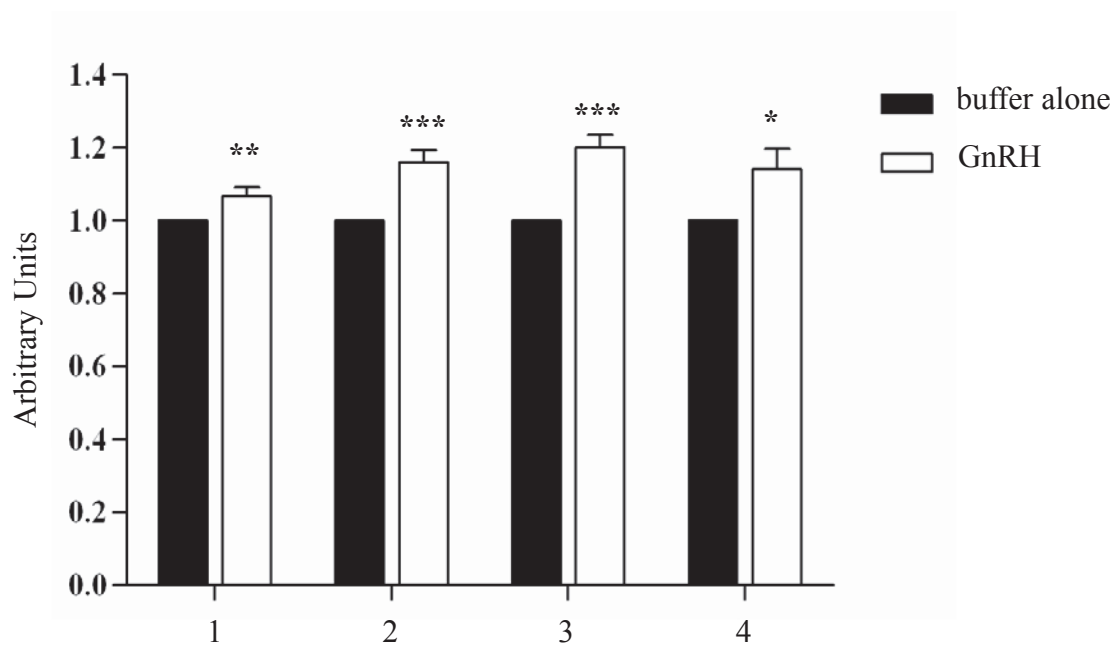
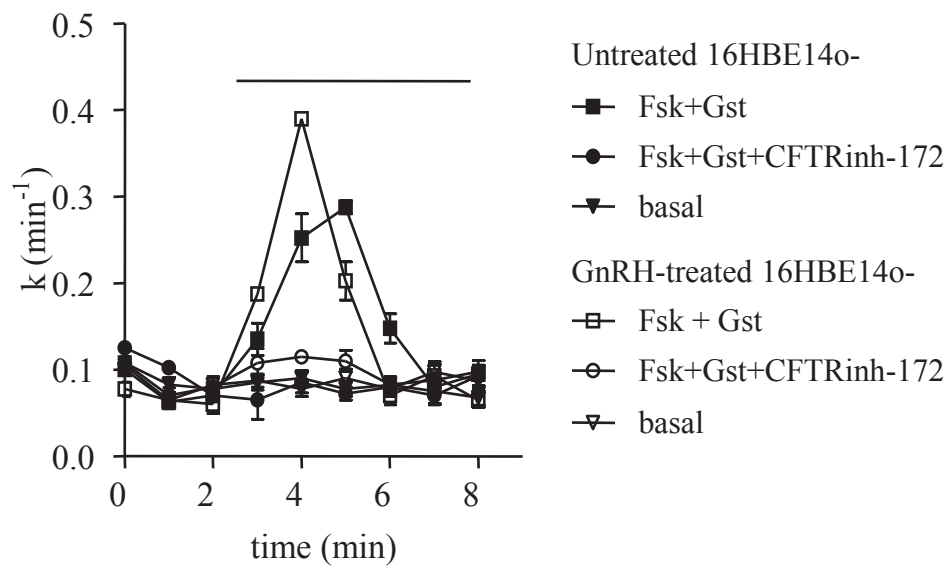


Figure 5

A



B

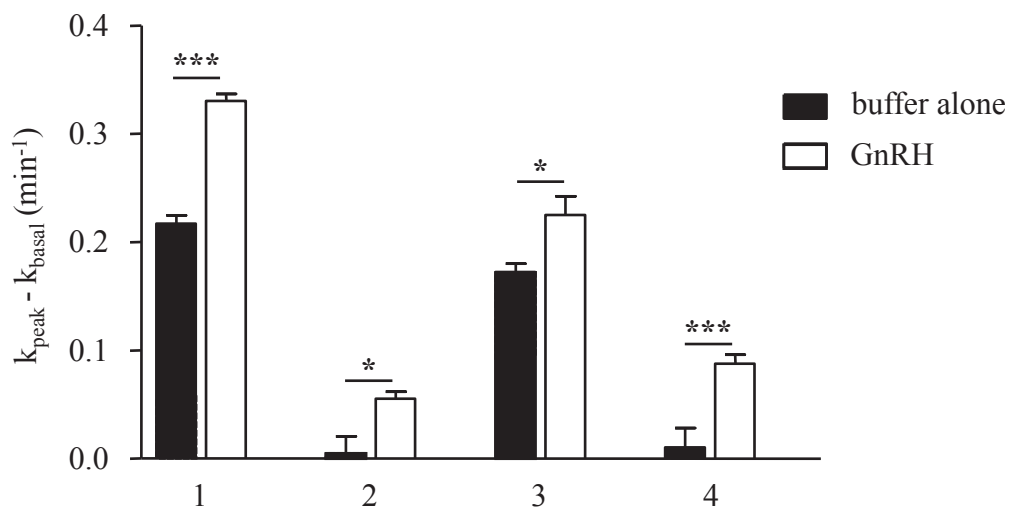


Figure 6

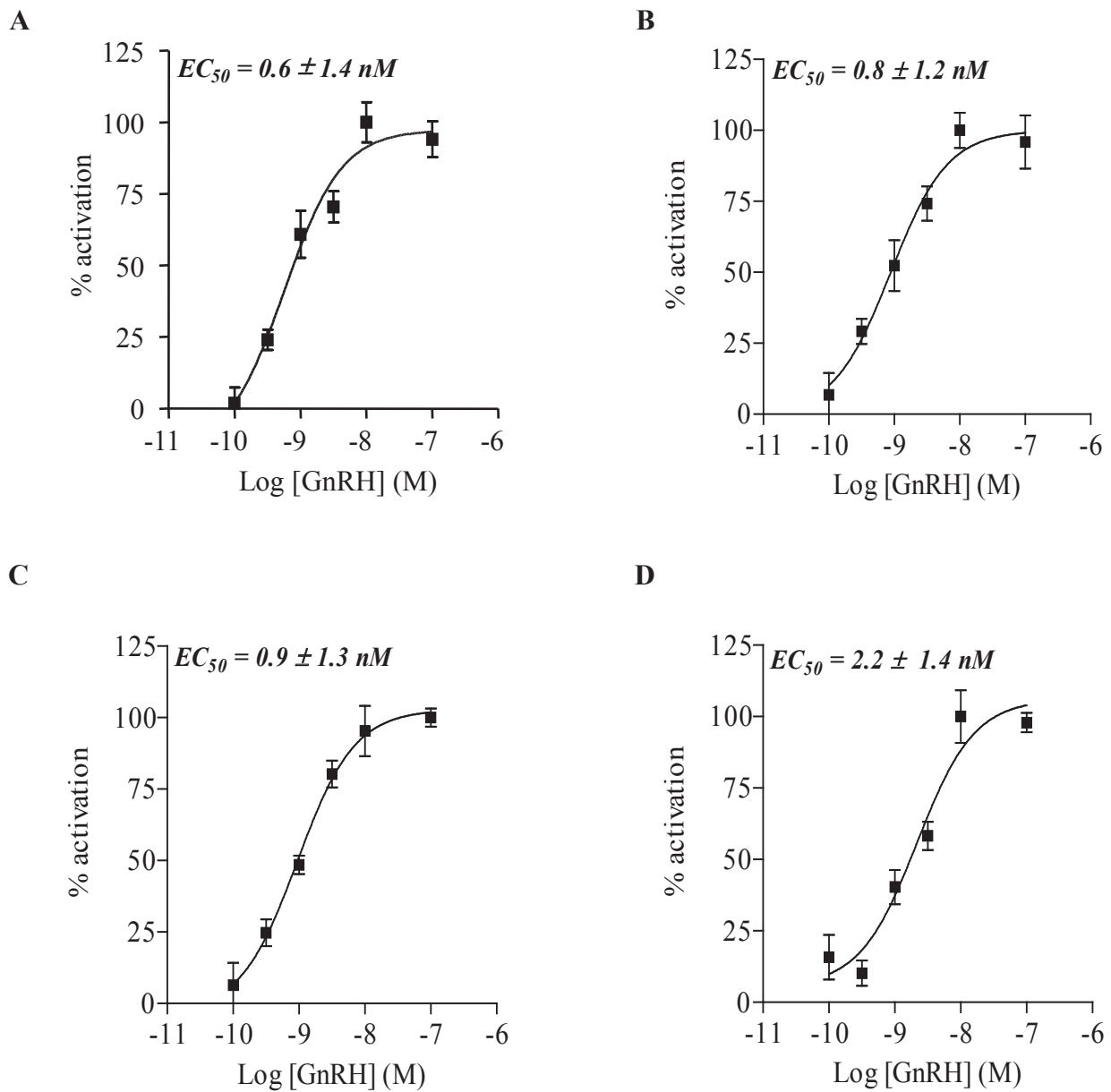
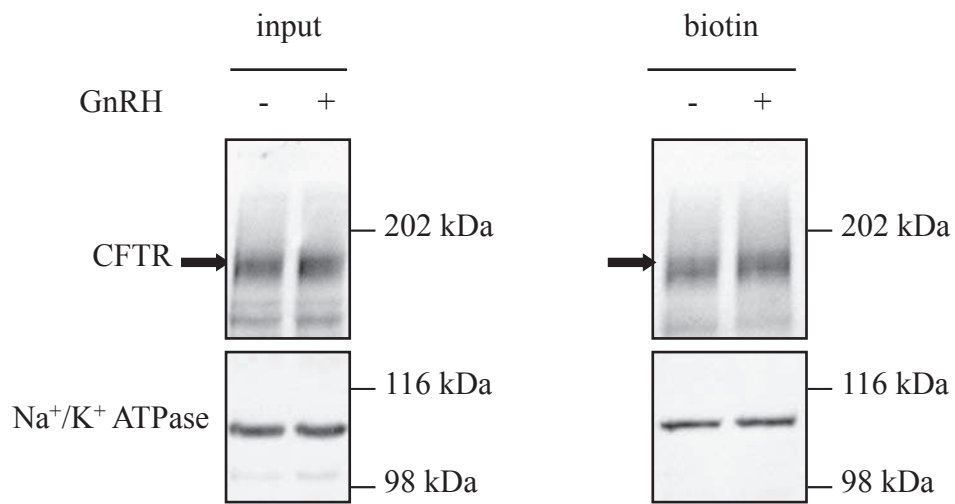
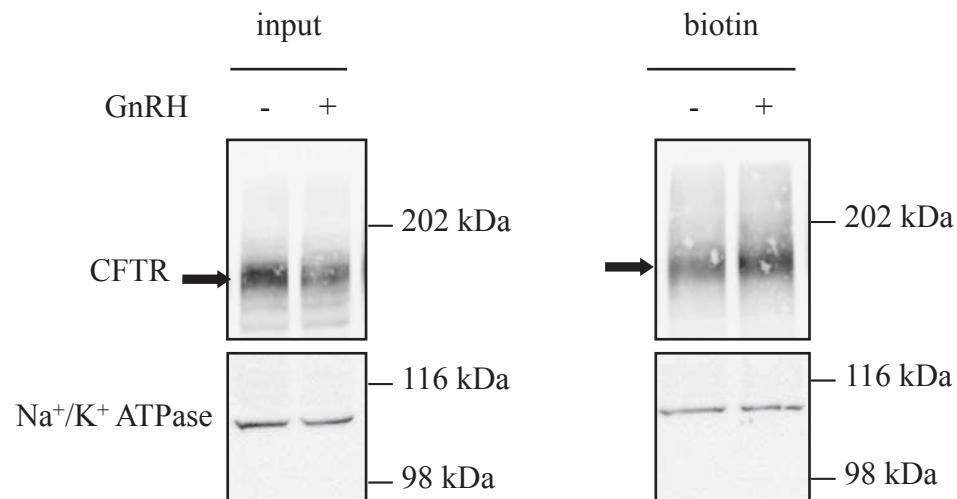


Figure 7

A



B



C

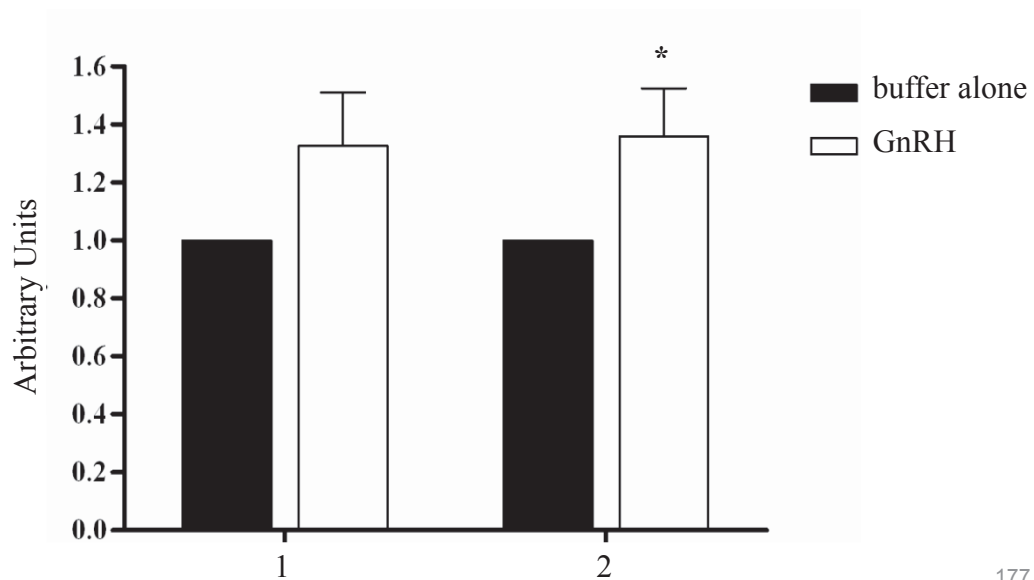
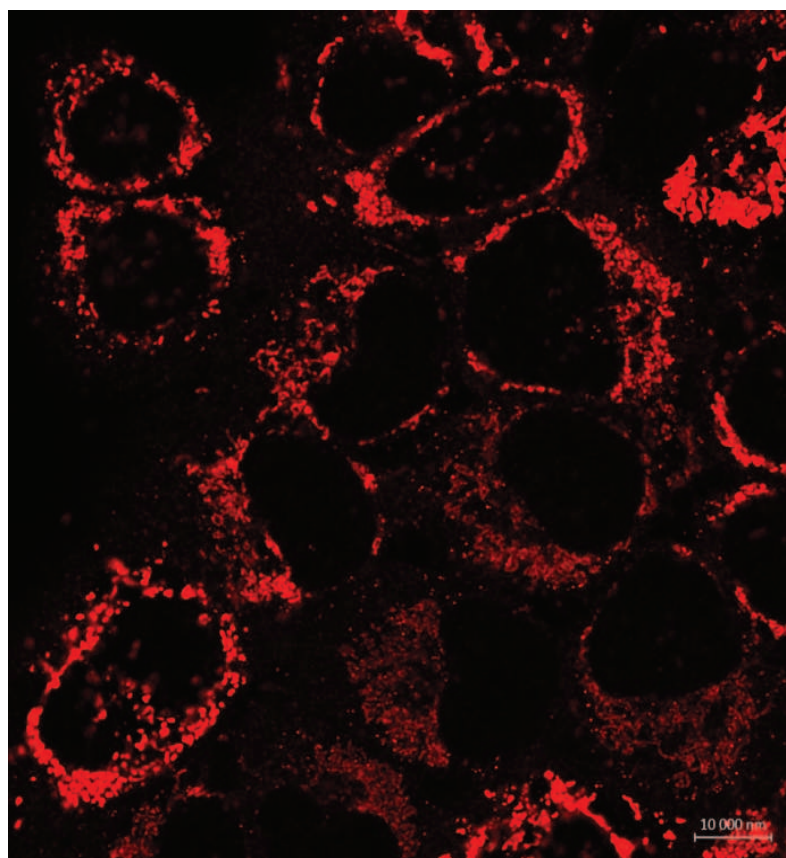


Figure 8

A



B

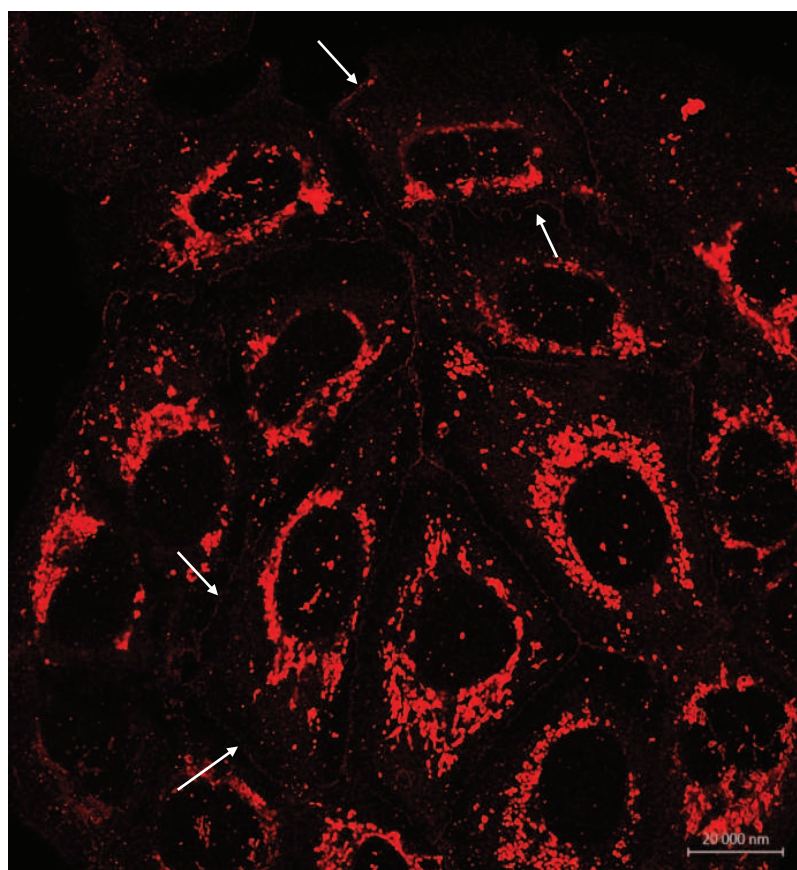
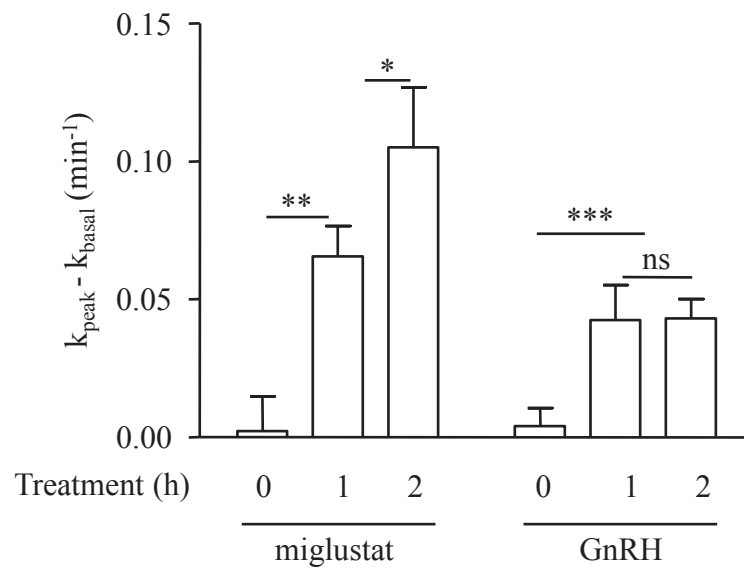
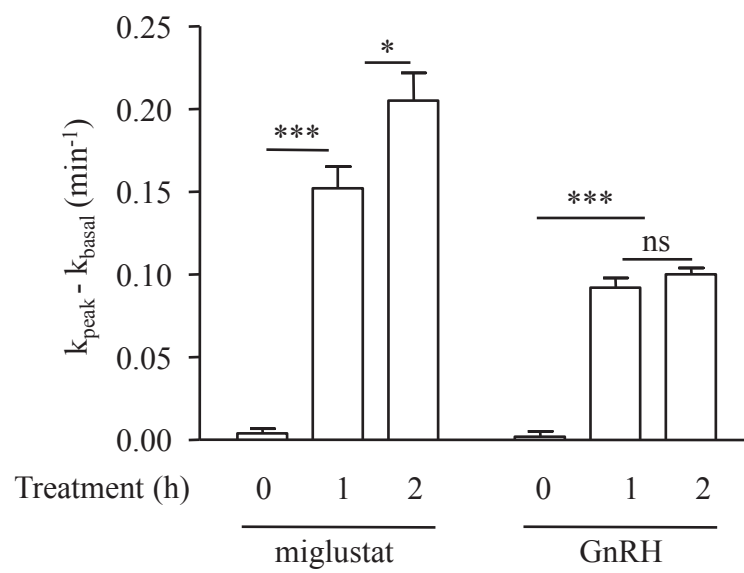


Figure 9

A



B



CONCLUSION GÉNÉRALE

-

Discussion et Perspectives

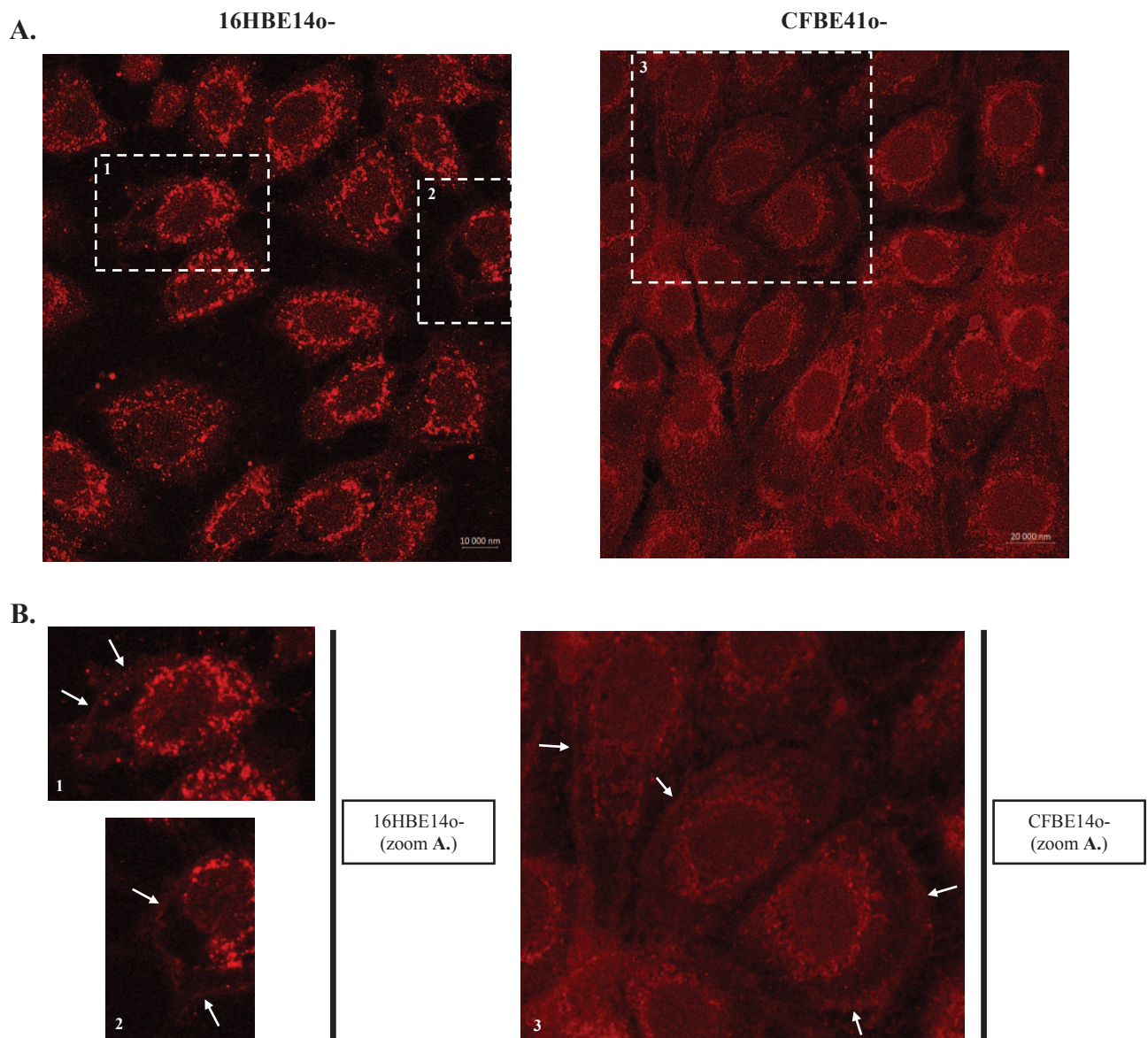


Figure 49 (A-B) : Localisation du RGNRH dans les lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o-

A. Observation en microscopie confocale du RGNRH (rouge) dans les lignées 16HBE14o- et CFBE41o- (images représentatives). Les deux types cellulaires étudiés présentent un marquage diffus et plus accentué dans la région péri-nucléaire. Pour certaines cellules, un liséré (plus ou moins fin) est également observé à la membrane plasmique (flèches blanches, **B.**)

Des contrôles, pour lesquels l'anticorps dirigé contre le RGNRH a été omis, ont également été réalisés (non montrés ici).

→ conditions de marquage (RGNRH) : Ac I^{aires} (clone GNRH03, 1/200^e) : incubation de 75 min à température ambiante, Ac II^{aires} (Cy3, 1/400^e) : incubation de 60 min à température ambiante

→ appareillage, conditions d'observation : LSM 780, Axio Observer (Carl Zeiss GmbH), Plan-Apochromat 63X/1.40 oil (immersion)

→ logiciel d'exploitation : Zen 2011, blue edition

Ac : anticorps, GnRH : *gonadotropin-releasing hormone*, min : minute, RGNRH : récepteur de la GnRH

marquages réalisés au sein de l'Inserm UMR 1078, Brest (N.Benz)

L'identification de molécules capables de corriger le défaut de repliement du CFTR-F508del ou d'affecter sa liaison avec certains protagonistes de l'ERQC, représente un enjeu considérable dans la recherche sur la mucoviscidose. Un nombre croissant d'études tendent cependant à montrer qu'en complément du réadressage du canal muté à la surface cellulaire, l'amélioration de sa stabilité dans la membrane plasmique et de son processus d'ouverture/fermeture représentent deux autres axes importants à considérer dans le développement de traitements efficaces pour les malades.

Des travaux effectués au sein de notre laboratoire ont identifié la protéine AnxA5 comme partenaire direct du canal CFTR (via NBD1) et établi un lien fonctionnel entre ces deux protéines (Trouvé *et al.*, 2007, Le Drévo *et al.*, 2008). L'AnxA5 présente différentes propriétés qui l'engagent dans le contrôle de la dynamique des membranes cellulaires : i) liaison Ca^{2+} -dépendante aux phospholipides membranaires et à l'actine-F et ii) formation d'auto-assemblages supramoléculaires au niveau des bicouches lipidiques. Influençant la mobilité des protéines dans la membrane plasmique, l'AnxA5 pourrait alors être impliquée dans la régulation de l'expression du canal CFTR à la surface cellulaire. Cette protéine permettrait d'élever le temps de résidence de la version sauvage du CFTR et de la version mutée F508del ayant échappée à l'ERAD dans la membrane plasmique.

Aux termes de ces travaux, nous nous sommes orientés vers la recherche d'une stratégie visant à augmenter le niveau d'expression de l'AnxA5 dans des cellules épithéliales respiratoires CF, laquelle serait applicable d'un point de vue thérapeutique. Considérant les informations fournies par la littérature, notre choix s'est porté sur la GnRH. Cette molécule, utilisée en thérapeutique humaine depuis plus de 25 ans, est en effet connue pour stimuler l'expression de l'AnxA5 dans les cellules gonadotropes ainsi que dans différents types cellulaires issus du tractus génital.

La GnRH exerce son action via sa liaison sur son récepteur, le RGnRH, membre de la famille des RCPG. Il a donc fallu nous assurer, en premier lieu, de sa présence dans les quatre modèles d'étude choisis, à savoir les lignées 16HBE14o- et CFBE41o- (et ses dérivées : CFBE41o-/wt et CFBE41o-/F508del). Ces modèles sont issus d'un épithélium bronchique humain exprimant de manière endogène la forme sauvage (16HBE14o-) ou mutée F508del (CFBE41o-) de la protéine CFTR.

L'expression du RGnRH hors de l'hypophyse est aujourd'hui bien établie. Sa présence, généralement associée à celle de la GnRH, a été rapportée dans de nombreux sites extra-hypophysaires (**Tableaux VIII et IX**, pour revue : Hapgood *et al.*, 2005). Néanmoins, cela reste peu décrit dans le système respiratoire (Koushik *et al.*, 2004, Sudaram *et al.*, 2009b, Taratula *et al.*, 2011), notamment en ce qui concerne le tissu normal humain. À l'issue de nos travaux, nous rapportons la présence du RGnRH au niveau messager (RT-PCR) et protéique (Western blot) pour les quatre lignées considérées. Les techniques d'immunocytochimie et de biotinylation des protéines membranaires ont permis de vérifier sa présence à la surface cellulaire (**Figures 49 et 50**). La mise en évidence du RGnRH dans différents tissus respiratoires animaux sains [bovin et rat (Koushik *et al.*, 2004, Koushik et Kompella, 2004, Sundaram *et al.*, 2009a)] et dans les lignées épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o- laisse envisager des implications possibles du système GnRH dans la physiologie des voies aériennes des mammifères.

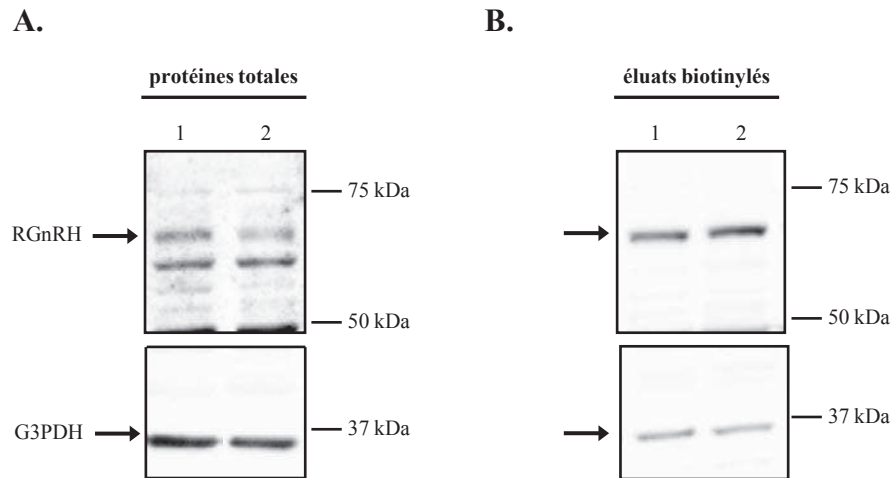


Figure 50 (A-B) : Étude de l'expression membranaire du RGNRH dans les lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o- par biotinylation

A et **B.** Images représentatives de Western blot témoignant de la présence du RGNRH dans les lysats cellulaires totaux (**A.**) et à la surface cellulaire (**B.**) des lignées 16HBE14o- (piste 1) et CFBE41o- (piste 2).

L'expression de la G3PDH est également évaluée, notamment dans les éluats, afin de s'assurer que seules les protéines membranaires ont été biotinylées et récupérées lors de nos expérimentations (Alcolado *et al.*, 2011). Sur les images présentées ici, la G3PDH est retrouvée dans les éluats biotinylés (**B.**), suggérant leur contamination par des protéines intracellulaires. Toutefois, l'intensité des bandes y est moindre, au regard de celle observée pour les lysats totaux (**A.**). Ainsi, il apparaît fort probable que la majorité des protéines retrouvées dans les éluats biotinylés reflètent la population exprimée à la surface cellulaire des lignées 16HBE14o- et CFBE41o-.

Ac : anticorps, GnRH : *gonadotropin-releasing hormone*, G3PDH : glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, RGNRH : récepteur de la GnRH

expériences de biotinylation réalisées au sein de l'Inserm UMR 1078, Brest (N.Benz)

L'étude protéique du RGnRH reste relativement discutée au sein de la communauté scientifique. Ceci s'explique par la faible spécificité des anticorps commerciaux. Ainsi, afin de valider le poids moléculaire de la bande d'intérêt identifiée lors de nos Western blot, des transfections cellulaires modulant l'expression du récepteur (pCMV6-XL5/GnRH-R et siRNA/GnRH-R) ont été effectuées en amont des immunodétections.

Suite à la validation de nos différents modèles d'étude, la modulation potentielle de l'expression de l'AnxA5 par la GnRH y a été évaluée. Nous montrons, pour la première fois, une augmentation significative de l'expression de l'AnxA5 dans des cellules épithéliales issues des voies aériennes humaines (non-CF et CF), suite à leur exposition à la GnRH. Cette augmentation, comprise entre 10 et 20 % selon le type cellulaire considéré, est observée dès 60 minutes d'incubation avec l'hormone.

L'objectif que nous nous étions initialement fixé a donc été atteint. Une molécule capable de stimuler l'expression de l'AnxA5 dans des cellules épithéliales bronchiques humaines exprimant la protéine CFTR-F508del a été identifiée : la GnRH. Les investigations se sont alors poursuivies par l'évaluation des effets engendrés par cette hormone sur les sécrétions ioniques dépendantes du canal CFTR.

Ces mesures d'activité ont été réalisées en collaboration avec le Professeur Frédéric Becq et le Docteur Caroline Norez du laboratoire STIM à Poitiers. La mise en œuvre de la technique des efflux d'iode a permis de mettre en évidence plusieurs faits intéressants.

Premièrement, les cellules traitées pendant 60 minutes avec la GnRH à 1 nM présentent une hausse significative de la sortie active des ions I⁻. L'utilisation d'un inhibiteur du CFTR, le CFTR_{inh172}, permet de garantir la spécificité des efflux d'iode observés suite à l'ajout des activateurs (Gst/Fsk). Cette élévation du flux d'halogénures est rapportée pour les cellules exprimant le CFTR-F508del ainsi que pour celles exprimant le CFTR-wt. Les cellules CFBE41o- prétraitées avec la GnRH montrent une sortie active d'ions I⁻ représentant environ 20 à 25 % de celle observée pour les cellules 16HBE14o- non stimulées. Les efflux d'iode mesurés pour les cellules CFBE41o-/F508del incubées avec la GnRH représentent, quant à eux, 40 et 45 % de ceux observés pour les cellules CFBE41o-/wt non traitées. De manière similaire à ce qui a été fait dans le cadre de l'étude sur le miglustat (Norez *et al.*, 2009), des investigations sont actuellement en cours afin d'évaluer la durée pendant laquelle perdure l'effet de la GnRH. Celles-ci consistent à incuber les cellules exprimant le CFTR-F508del pendant 60 minutes avec la GnRH, à la suite desquelles la molécule est retirée. L'activité du canal CFTR est alors mesurée dès l'arrêt du traitement puis toutes les 2 heures pendant 12 heures.

Deuxièmement, la réalisation d'une gamme GnRH a permis de déterminer la CE₅₀ (concentration efficace 50, EC₅₀). Ce paramètre important correspond à la concentration pour laquelle 50 % de l'effet maximal de l'hormone est observé. Cette dernière s'avère relativement faible, comprise entre 0.6 et 2.2 nM. Par ailleurs, une augmentation maximale des efflux d'iode est observée pour une stimulation à 10 nM, quelque soit le type cellulaire considéré.

Enfin, l'amplitude des efflux d'iodure a été évalué dans les lignées CFBE41o- et CFBE41o-/F508del suite à 1 heure et 2 heures d'incubation avec la GnRH (« *time-dependence* »). Ces expérimentations ont été menées en parallèle avec le correcteur miglustat utilisé à 100 μ M. À la différence de la GnRH, pour laquelle aucune variation dans la sortie active des ions I⁻ n'est observée, l'efflux rapporté suite à 2 heures de traitement avec le miglustat est plus important que celui mesuré après une heure d'incubation. Ces observations pourraient sous-entendre, pour cette condition de stimulation, des modes d'action différents entre les deux molécules.

Nous pouvons corréler cette hausse du transport ionique dépendant du CFTR avec une augmentation de l'expression membranaire du canal. En effet, suite à leur stimulation par la GnRH, les cellules présentent une quantité plus importante de canaux CFTR à la surface cellulaire. Rapportée pour les modèles exprimant le CFTR-wt, nous n'avons malheureusement pas réussi, via la technique de biotinylation des protéines membranaires, à mettre en évidence cette augmentation pour les lignées exprimant le mutant F508del de la protéine CFTR, en dépit des observations faites lors des expérimentations d'efflux d'iodure. Une expression faible du canal muté à la membrane et le manque de sensibilité du Western blot pourraient permettre d'expliquer les difficultés rencontrées.

Il a alors été entrepris d'évaluer l'effet de la GnRH sur la localisation membranaire du CFTR-F508del par immunocytochimie. L'interprétation des résultats obtenus demeure difficile. En effet, certaines cellules présentent un marquage plus étalé (pouvant sous-entendre une redistribution du CFTR muté vers la périphérie) et d'autres, un marquage encore bien prononcé au niveau de la région péri-nucléaire. Néanmoins, comparativement aux cellules non traitées, un fin liséré dessinant le contour des cellules (membrane plasmique) peut être observé suite à une incubation de 2 heures avec la GnRH.

À la question : « un traitement avec la GnRH conduit-il à une amélioration des sécrétions dépendantes du canal ionique CFTR ? », la réponse est oui. À partir de là, de nombreuses investigations demandent à être réalisées afin d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués permettant d'aboutir à ces observations. Considérant les niveaux d'augmentation de l'expression intracellulaire de l'AnxA5 [significatifs mais pas excessifs (10 à 20 %)] et les résultats obtenus lors des expérimentations d'efflux d'iodure suite au traitement avec la GnRH, il apparaît plus que probable que d'autres mécanismes indépendants de l'AnxA5 soient engagés dans l'effet positif observé. Cette idée est également renforcée au vu de la multitude de voies de signalisation susceptibles d'être activées et de gènes pouvant être régulés suite à la liaison de la GnRH sur son récepteur. Par ailleurs, les bénéfices d'une stimulation par l'hormone ayant été rapportés pour les modèles d'étude non-CF et CF, il est tout à fait possible d'imaginer que des acteurs de la signalisation du RGnRH, de même que certains produits finaux de celle-ci (protéines sur et/ou sous-exprimées), affectent différents niveaux de régulation de la protéine CFTR. Ainsi, ils pourraient influencer le devenir de la protéine CFTR dans les étapes précoces de la voie de sécrétion (biosynthèse dans le RE, transport intracellulaire) ainsi que son comportement dans les compartiments post-golgien et apical (insertion dans la membrane plasmique, activation, stabilité).

La mise en œuvre de cellules « *knock-out* » pour l'AnxA5 permettrait de vérifier l'implication de cette dernière dans la régulation du CFTR (wt et F508del) suite au traitement avec la GnRH. La mesure de l'activité du CFTR après une incubation avec la GnRH, menée en parallèle sur des cellules présentant ou pas une inactivation du gène, permettrait d'évaluer l'engagement de l'AnxA5 dans les effets observés. Il pourrait également être intéressant de regarder l'impact d'une stimulation par la GnRH sur la localisation intracellulaire de l'AnxA5. Cette dernière conduit-elle à une mobilisation massive de l'annexine à la membrane plasmique ?

Dans les cellules gonadotropes, il est couramment admis que la synthèse et la sécrétion des gonadotropines reposent majoritairement sur le couplage du RGnRH avec la sous-unité $G\alpha_q/11$ et l'activation de la voie de la $PLC\beta$. Toutefois, une contribution de la sous-unité $G\alpha_s$ a également été mentionnée. Dans le cas des cellules tumorales, notamment celles issues de tumeurs hormono-dépendantes, les effets engendrés par les analogues de la GnRH s'expliqueraient, quant à eux, principalement par l'activation de la sous-unité $G\alpha_i$ (pour revue : Naor et Huhtaniemi, 2012). La signalisation mise en place dans les cellules non gonadotropes et non tumorales reste à ce jour peu documentée. De plus, il est important de rappeler que cette signalisation intracellulaire est fortement dépendante du contexte cellulaire, de la concentration de GnRH utilisée et de la fréquence de stimulation.

Afin de vérifier un couplage potentiel du RGnRH avec la sous-unité $G\alpha_q/11$ suite à nos conditions de stimulation, des études sur les mouvements calciques ont été entreprises dans les lignées 16HBE14o- et CFBE41o-. Ces expérimentations ont été menées au laboratoire STIM à Poitiers, auxquelles j'ai eu l'opportunité de prendre part. Deux schémas de travail ont été entrepris. D'un côté, la mobilisation calcique est évaluée en temps réel suite au traitement des cellules avec 1 nM de GnRH (« *acute stimulation* »). De l'autre, les cellules sont préalablement incubées pendant 1 à 2 heures avec la GnRH, à la suite desquelles l'ajout de diverses molécules (ATP, histamine) permet d'évaluer une éventuelle modification de la signalisation calcique. Considérant les résultats obtenus, il semblerait que dans nos modèles d'étude et avec nos conditions de stimulation aucun mouvement calcique, tel que la vidange des stocks du RE ($IP3/IP3R$), ne soit engendré. Ainsi, les effets observés au niveau des efflux d'iodure impliqueraient des mécanismes non dépendants du calcium. Connaissant l'importance de cet ion dans la plupart des propriétés décrites pour l'AnxA5, la perspective d'une élévation transitoire de sa concentration intracellulaire lui aurait été profitable. Une concentration en ions Ca^{2+} de l'ordre du mM est en effet nécessaire pour une relocalisation massive des monomères d'AnxA5 à la surface cellulaire et leur auto-assemblage en trimères, structure affectant la fluidité membranaire. Une réponse calcique aurait également pu être engagée dans l'activation indirecte du CFTR. En effet, il a été proposé récemment que le canal CFTR pouvait fonctionner comme les CaCCs et répondre à une stimulation cholinergique. Au moins trois mécanismes dépendants du calcium ont été décrits pour stimuler le CFTR : i) la régulation de certaines isoformes de l'AC par les ions Ca^{2+} , ii) la stimulation du complexe Pyk2/Src, qui inhibe l'activité phosphatase de la PP2A, et iii) la phosphorylation directe du CFTR par le complexe Pyk2/Src (résidu tyrosine) (Billet *et al.*, 2013a, pour revue : Billet et Hanrahan, 2013).

Bien que la voie de la PLC β ne semble pas activée dans nos modèles selon nos conditions de stimulation, un éventuel couplage du RGnRH avec la sous-unité G α q/11 aurait permis d'envisager un rôle pour certaines isoformes de la PKC dans les différentes observations rapportées. En effet, à côté de la voie AMPc/PKA, des kinases telles que la PKC ont aussi montré leur importance dans la régulation de l'activation du CFTR. Cette dernière est capable de stimuler seule le canal ionique, d'améliorer son activation par le PKA (Chappe *et al.*, 2003, Chappe *et al.*, 2004) et d'élever la sécrétion Cl⁻ AMPc-dépendante en augmentant la quantité de canaux CFTR actifs dans la membrane apicale des cellules épithéliales (Chappe *et al.*, 2008, Rafferty *et al.*, 2009). La réduction du taux d'endocytose est l'un des mécanismes proposés pour expliquer l'augmentation de la quantité de CFTR à la surface cellulaire par la PKC (Lukacs *et al.*, 1997, Chappe *et al.*, 2008). Des expériences conduites dans la lignée cellulaire Calu-3 montrent l'engagement de l'isoforme ϵ des nPKC dans la modulation de l'activité du canal CFTR, via le complexe apical qu'elle forme avec RACK1 (*receptor for activated C kinase*) et NHERF1 (Liedtke et Cole, 1998, Liedtke *et al.*, 2004) (**Figure 23**). Plus récemment, Alcolado et collaborateurs ont impliqué cette même isoforme des nPKC dans l'insertion membranaire VIP-dépendante (*vasoactive intestinal peptide*) du CFTR (wt et F508del) (Alcolado *et al.*, 2011).

Une autre voie également intéressante à explorer, au vu de l'activation AMPc-dépendante du canal CFTR, est celle de l'AC. Cette dernière pourrait supposer un couplage du RGnRH à la sous-unité G α s suite à la liaison de son ligand.

Lors d'une étude transcriptomique menée sur les cellules gonadotropes murines L β T2, Kakar et collaborateurs ont rapporté que leur stimulation par un agoniste de la GnRH (100 nM) a abouti à l'altération de l'expression de près de 450 gènes (Kakar *et al.*, 2003). S'inspirant de ce travail, une investigation nécessaire à conduire dans nos modèles serait l'établissement d'un différentiel d'expression protéique entre cellules traitées et non traitées avec la GnRH (1 nM). Nous projetons de réaliser des expériences d'électrophorèse 2D à partir de lysats protéiques issus des cellules non-CF et CF. Suite à la sélection des protéines candidates (choix des spots : présence/absence, sur/sous-exprimés), l'analyse par spectrométrie de masse permettra d'identifier des protéines susceptibles d'être impliquées dans l'élévation des flux ioniques, observée suite à une incubation avec la GnRH. Une première approche pourra être établie par l'électrophorèse 2D conventionnelle mais l'électrophorèse 2D-DIGE (*2-dimensional differential in-gel electrophoresis*) apparaît plus pertinente dans le cadre de cette analyse protéomique comparative. Cette dernière offre la possibilité d'analyser plus finement les variations d'expression de protéines en réponse à un traitement avec la GnRH. Par ailleurs, cette étude protéomique pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques qu'il pourrait être intéressant d'approfondir. De plus, quelques pistes quant aux voies activées suite à la liaison de l'hormone sur son récepteur pourraient être fournies à travers ces identifications.

L'obtention d'informations relatives à la signalisation intracellulaire mise en place dans nos modèles (voies activées et produits finaux engendrés) est essentielle pour la compréhension des effets positifs observés.

À ce propos, au vu des observations faites pour les cellules CF (efflux d'iode et immunocytochimie), n'est-il pas possible d'imaginer qu'une incubation avec la GnRH conduise à un réadressage du CFTR-F508del à la membrane plasmique ? Toutefois, considérant les multiples travaux menés sur les correcteurs et conduits dans les mêmes modèles cellulaires que ceux utilisés lors de notre étude, nos expériences de biotinylation auraient dû révéler une augmentation de l'expression du CFTR-F508del à la surface cellulaire. Par ailleurs, le miglustat et la GnRH présentent des résultats différents en terme de « *time-dependence* » et une incubation avec le miglustat (2 heures, 100 μ M) n'a pas d'effet sur des cellules exprimant le CFTR-wt. Une investigation à mener serait de soumettre nos modèles cellulaires CF à une thérapie combinée miglustat + GnRH. La mise en évidence d'un effet synergique sur le transport ionique dépendant du CFTR sous-entendrait, pour ces molécules, des cibles différentes ou des actions à différents niveaux. Compte tenu du bénéfice également observé pour les modèles cellulaires non-CF, il est possible que la liaison de la GnRH sur son récepteur conduise à l'activation de voies affectant *in fine* la stabilité du CFTR à la surface cellulaire. Une façon de vérifier cette hypothèse serait de traiter nos cellules avec la GnRH et un inhibiteur de l'endocytose dépendante des dynamines, comme la dynasore. Par ailleurs, et ce qui semble peut-être plus plausible au vu du temps relativement court de stimulation, l'incubation avec la GnRH pourrait modifier l'expression ou l'activité d'une protéine qui faciliterait l'insertion du CFTR (wt et F508del) dans la membrane plasmique [à partir d'un pool de CFTR mature sous-membranaire (compartiment endosomal)]. C'est l'hypothèse qui a récemment été retenue pour expliquer l'amélioration du transport ionique AMPc-dépendant (CFTR-wt et -F508del) dans des cellules prétraitées avec le peptide vasoactif intestinal (Alcolado *et al.*, 2011).

De façon intéressante, des analogues de la GnRH, tels que la Nafaréline, la Leuproréline et la Busaréline, sont actuellement disponibles sous forme d'aérosol et de spray nasal. Dans l'éventuelle perspective de leur utilisation chez les patients CF, la mise en place d'un tel traitement devra être extrêmement réfléchie. Traiter un enfant atteint de mucoviscidose avec une hormone n'est pas anodin et demeure controversé. Bien que faible, la biodisponibilité de la Leuproréline suite à une administration par spray nasal et aérosol (solution) est décrite. Elle a été évaluée, chez des volontaires sains, respectivement à 2.4 % et 6.6 %. Cette dernière atteint 28 % pour une administration sous forme d'aérosol en suspension (Adjei *et al.*, 1992). Il est important de rappeler que chez les personnes en âge de procréer, des traitements continus d'analogues de la GnRH (troubles endocriniens, cancers hormono-dépendants et autres pathologies hormono-indépendantes) conduisent principalement à des symptômes comparables à ceux de la ménopause et de l'andropause et à une déperdition osseuse.

Une question qui se poserait devant l'administration de cette médication hormonale sous forme d'aérosol ou de spray nasal serait : quand traiter ? Il semblerait logique d'intervenir après la puberté,

de même qu'en dehors des épisodes de surinfections et suite au désencombrement préalable de l'arbre bronchique. Afin de maximiser les effets bénéfiques et de minimiser les effets secondaires, toute la difficulté dans la mise en place éventuelle d'une telle thérapie résiderait dans l'équilibre à trouver entre la dose à prescrire, la fréquence d'administration et la durée des traitements. Un autre paramètre à prendre en considération est la dégradation enzymatique de la GnRH par l'épithélium des voies aériennes. À titre d'exemple, une étude menée sur la lignée cellulaire Calu-1 rapporte une dégradation de l'ordre de 30 % de la Desloréline, suite à son incubation pendant 1 heure avec la fraction membranaire de ces cellules (Koushik *et al.*, 2003).

Pour conclure, nous rapportons l'expression du RGnRH dans des lignées cellulaires issues d'épithélia bronchiques humains non-CF et CF et validons sa présence dans la membrane plasmique. Nous montrons également qu'un traitement de 1 heure avec la GnRH à la concentration de 1 nM stimule l'expression intracellulaire de l'AnxA5 et conduit à une élévation du transport ionique dépendant du CFTR, laquelle corrèle avec une augmentation de l'expression membranaire du canal (wt et F508del). Cependant, nous ne sommes pas en mesure, à l'issue de ces travaux, de nous prononcer catégoriquement quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet positif observé. De nombreuses investigations demandent à être poursuivies afin d'élucider, pour nos conditions de stimulation, la signalisation intracellulaire associée au RGnRH, qui affecterait *in fine* le devenir de la protéine CFTR.

Afin de confirmer nos observations, nous nous sommes dernièrement orientés vers l'utilisation de modèles de cultures primaires de cellules épithéliales nasales (HNEC, *human nasal epithelial cells*) et bronchiques (HBEC, *human bronchial epithelial cells*) humaines non-CF et CF. Il s'agira d'y vérifier la présence du RGnRH pour y explorer les effets engendrés par la GnRH et certains de ces analogues (déjà utilisés en thérapeutique humaine) sur les courants médiés par le canal CFTR. Ces effets seront évalués grâce à la technologie Port-a-Patch® (Nanion Technologies GmbH, Munich, Germany). La mise en place de cultures en configuration air-liquide permettra de mesurer, en chambre de Ussing, les transports ioniques à travers des cultures polarisées, traitées ou non avec l'hormone.

Pour finir, j'aimerais rappeler qu'espérer améliorer efficacement le phénotype des patients homozygotes pour la mutation F508del nécessite d'agir simultanément sur les trois anomalies majeures engendrées par la perte de ce résidu : biosynthèse dans le RE, processus d'ouverture/fermeture du canal et stabilité à la surface cellulaire. Une telle molécule n'existe malheureusement pas encore à l'heure actuelle. Néanmoins, les résultats prometteurs d'essais cliniques récents pourraient permettre de proposer très prochainement aux patients des stratégies de bithérapies.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adjei, A., Sundberg, D., Miller, J., and Chun, A.** (1992). Bioavailability of leuprolide acetate following nasal and inhalation delivery to rats and healthy humans. *Pharm Res* 9, 244-249.
- Aguilar-Rojas, A., and Huerta-Reyes, M.** (2009). Human gonadotropin-releasing hormone receptor-activated cellular functions and signaling pathways in extra-pituitary tissues and cancer cells (Review). *Oncol Rep* 22, 981-990.
- Akabas, M.H., Cheung, M., and Guinamard, R.** (1997). Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel. *J Bioenerg Biomembr* 29, 453-463.
- Alcolado, N., Conrad, D.J., Rafferty, S., Chappe, F.G., and Chappe, V.M.** (2011). VIP-dependent increase in F508del-CFTR membrane localization is mediated by PKCepsilon. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C53-65.
- Aleksandrov, L., Aleksandrov, A.A., Chang, X.B., and Riordan, J.R.** (2002). The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *J Biol Chem* 277, 15419-15425.
- Ali, S.M., Geisow, M.J., and Burgoyne, R.D.** (1989). A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature* 340, 313-315.
- Amaral, M.D.** (2004). CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci* 23, 41-48.
- Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., and Guillemin, R.** (1971). Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun* 44, 205-210.
- Andersen, D.H.** (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 56, 344-399.
- Andersen, D.H., and Hodges, R.G.** (1946). Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 72, 62-80.
- Andersen, M.H., Berglund, L., Petersen, T.E., and Rasmussen, J.T.** (2002). Annexin-V binds to the intracellular part of the beta(5) integrin receptor subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 550-557.
- Anderson, M.P., Berger, H.A., Rich, D.P., Gregory, R.J., Smith, A.E., and Welsh, M.J.** (1991a). Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 67, 775-784.
- Anderson, M.P., Gregory, R.J., Thompson, S., Souza, D.W., Paul, S., Mulligan, R.C., Smith, A.E., and Welsh, M.J.** (1991b). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253, 202-205.
- Ando-Akatsuka, Y., Abdullaev, I.F., Lee, E.L., Okada, Y., and Sabirov, R.Z.** (2002). Down-regulation of volume-sensitive Cl⁻ channels by CFTR is mediated by the second nucleotide-binding domain. *Pflugers Arch* 445, 177-186.
- Andree, H.A., Stuart, M.C., Hermens, W.T., Reutelingsperger, C.P., Hemker, H.C., Frederik, P.M., and Willems, G.M.** (1992). Clustering of lipid-bound annexin V may explain its anticoagulant effect. *J Biol Chem* 267, 17907-17912.
- Anguiano, A., Oates, R.D., Amos, J.A., Dean, M., Gerrard, B., Stewart, C., Maher, T.A., White, M.B., and Milunsky, A.** (1992). Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. *JAMA* 267, 1794-1797.
- Anjum, S., Krishna, A., Sridaran, R., and Tsutsui, K.** (2012). Localization of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH), Gonadotropin-Inhibitory Hormone (GnIH), Kisspeptin and GnRH Receptor and Their Possible Roles in Testicular Activities From Birth to Senescence in Mice. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 317, 630-644.
- Antigny, F., Norez, C., Becq, F., and Vandebrouck, C.** (2011). CFTR and Ca Signaling in Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol* 2, 67.
- Antigny, F., Norez, C., Becq, F., and Vandebrouck, C.** (2008a). Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. *Cell Calcium* 43, 175-183.
- Antigny, F., Norez, C., Cantereau, A., Becq, F., and Vandebrouck, C.** (2008b). Abnormal spatial diffusion of Ca²⁺ in F508del-CFTR airway epithelial cells. *Respir Res* 9, 70.
- Antigny, F., Norez, C., Dannhoffer, L., Bertrand, J., Raveau, D., Corbi, P., Jayle, C., Becq, F., and Vandebrouck, C.** (2010). Transient receptor potential canonical channel 6 links Ca²⁺ mishandling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44, 83-90.
- Arencibia, J.M., and Schally, A.V.** (2000). Luteinizing hormone-releasing hormone as an autocrine growth factor in ES-2 ovarian cancer cell line. *Int J Oncol* 16, 1009-1013.
- Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E., Mohler, W., and Han, D.K.** (2003). Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 4, 587-598.

Aubin, C.N., and Linsdell, P. (2006). Positive charges at the intracellular mouth of the pore regulate anion conduction in the CFTR chloride channel. *J Gen Physiol* 128, 535-545.

Audrezet, M.P., Chen, J.M., Le Marechal, C., Ruzsiewicz, P., Robaszkiewicz, M., Raguenes, O., Quere, I., Scotet, V., and Ferec, C. (2002). Determination of the relative contribution of three genes-the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene-to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis. *Eur J Hum Genet* 10, 100-106.

Audrezet, M.P., Chen, J.M., Raguenes, O., Chuzhanova, N., Giteau, K., Le Marechal, C., Quere, I., Cooper, D.N., and Ferec, C. (2004). Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat* 23, 343-357.

Avella, M., Lorient, C., Bouloukos, K., Borgese, F., and Ehrenfeld, J. (2010). SLC26A9 stimulates CFTR expression and function in human bronchial cell lines. *J Cell Physiol* 226, 212-223.

B

Bai, Y., Li, M., and Hwang, T.C. (2011). Structural basis for the channel function of a degraded ABC transporter, CFTR (ABCC7). *J Gen Physiol* 138, 495-507.

Baker, J.M., Hudson, R.P., Kanelis, V., Choy, W.Y., Thibodeau, P.H., Thomas, P.J., and Forman-Kay, J.D. (2007). CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat Struct Mol Biol* 14, 738-745.

Baldursson, O., Ostedgaard, L.S., Rokhlina, T., Cotten, J.F., and Welsh, M.J. (2001). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels with R domain deletions and translocations show phosphorylation-dependent and -independent activity. *J Biol Chem* 276, 1904-1910.

Baldwin, J.M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* 12, 1693-1703.

Baram, T., Koch, Y., Hazum, E., and Fridkin, M. (1977). Gonadotropin-releasing hormone in milk. *Science* 198, 300-302.

Barr, F.A., Puype, M., Vandekerckhove, J., and Warren, G. (1997). GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* 91, 253-262.

Bartoszewski, R., Rab, A., Jurkuvenaite, A., Mazur, M., Wakefield, J., Collawn, J.F., and Bebek, Z. (2008). Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 448-457.

Basile, A., Pascale, M., Franceschelli, S., Nieddu, E., Mazzei, M.T., Fossa, P., Turco, M.C., and Mazzei, M. (2012). Matrine modulates HSC70 levels and rescues DeltaF508-CFTR. *J Cell Physiol* 227, 3317-3323.

Bear, C.E., Duguay, F., Naismith, A.L., Kartner, N., Hanrahan, J.W., and Riordan, J.R. (1991). Cl⁻ channel activity in *Xenopus* oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J Biol Chem* 266, 19142-19145.

Bear, C.E., Li, C.H., Kartner, N., Bridges, R.J., Jensen, T.J., Ramjeesingh, M., and Riordan, J.R. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68, 809-818.

Beauvillain, J.C. (2008). Le cerveau et la reproduction : le réseau neuronal à GnRH. *MT / médecine de la reproduction, gynécologie et endocrinologie* Volume 10, Numéro 2, 94-104.

Bebek, Z., Collawn, J.F., Wakefield, J., Parker, W., Li, Y., Varga, K., Sorscher, E.J., and Clancy, J.P. (2005). Failure of cAMP agonists to activate rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o- airway epithelial monolayers. *J Physiol* 569, 601-615.

Bebek, Z., Venglarik, C.J., Panczel, Z., Jilling, T., Kirk, K.L., and Sorscher, E.J. (1998). Activation of DeltaF508 CFTR in an epithelial monolayer. *Am J Physiol* 275, C599-607.

Becq, F., Fanjul, M., Merten, M., Figarella, C., Hollande, E., and Gola, M. (1993). Possible regulation of CFTR-chloride channels by membrane-bound phosphatases in pancreatic duct cells. *FEBS Lett* 327, 337-342.

Becq, F., Jensen, T.J., Chang, X.B., Savoia, A., Rommens, J.M., Tsui, L.C., Buchwald, M., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (1994). Phosphatase inhibitors activate normal and defective CFTR chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9160-9164.

Becq, F., Mettey, Y., Gray, M.A., Galletta, L.J., Dormer, R.L., Merten, M., Metaye, T., Chappe, V., Marvingt-Mounir, C., Zegarra-Moran, O., et al. (1999). Development of substituted Benzo[c]quinolinizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel. *J Biol Chem* 274, 27415-27425.

Beermann ofm cap, B.B., Hinz, H.J., Hofmann, A., and Huber, R. (1998). Acid induced equilibrium unfolding of annexin V wild type shows two intermediate states. *FEBS Lett* 423, 265-269.

Belchetz, P.E., Plant, T.M., Nakai, Y., Keogh, E.J., and Knobil, E. (1978). Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202, 631-633.

Belisle, S., Guevin, J.F., Bellabarba, D., and Lehoux, J.G. (1984). Luteinizing hormone-releasing hormone binds to enriched human placental membranes and stimulates in vitro the synthesis of bioactive human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 59, 119-126.

- Ben-Chetrit, A., Antenos, M., Jurisicova, A., Pasyk, E.A., Chitayat, D., Foskett, J.K., and Casper, R.F.** (2002). Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator during early human embryo development. *Mol Hum Reprod* 8, 758-764.
- Benevolensky, D., Belikova, Y., Mohammadzadeh, R., Trouve, P., Marotte, F., Russo-Marie, F., Samuel, J.L., and Charlemagne, D.** (2000). Expression and localization of the annexins II, V, and VI in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Lab Invest* 80, 123-133.
- Benharouga, M., Sharma, M., So, J., Haardt, M., Drzymala, L., Popov, M., Schwapach, B., Grinstein, S., Du, K., and Lukacs, G.L.** (2003). The role of the C terminus and Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor in the functional expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in nonpolarized cells and epithelia. *J Biol Chem* 278, 22079-22089.
- Bensalem, N., Ventura, A.P., Vallee, B., Lipecka, J., Tondelier, D., Davezac, N., Dos Santos, A., Perretti, M., Fajac, A., Sermet-Gaudelus, I., et al.** (2005). Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients. *Mol Cell Proteomics* 4, 1591-1601.
- Berendes, R., Voges, D., Demange, P., Huber, R., and Burger, A.** (1993). Structure-function analysis of the ion channel selectivity filter in human annexin V. *Science* 262, 427-430.
- Berger, H.A., Travis, S.M., and Welsh, M.J.** (1993). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 268, 2037-2047.
- Bertrand, C.A., Zhang, R., Pilewski, J.M., and Frizzell, R.A.** (2009). SLC26A9 is a constitutively active, CFTR-regulated anion conductance in human bronchial epithelia. *J Gen Physiol* 133, 421-438.
- Beyers, E.M., Comfurius, P., and Zwaal, R.F.** (1983). Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta* 736, 57-66.
- Bianchet, M.A., Ko, Y.H., Amzel, L.M., and Pedersen, P.L.** (1997). Modeling of nucleotide binding domains of ABC transporter proteins based on a F1-ATPase/recA topology: structural model of the nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Bioenerg Biomembr* 29, 503-524.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeve, M.K., and Poolman, B.** (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* 580, 1023-1035.
- Bilan, F., Thoreau, V., Nacfer, M., Derand, R., Norez, C., Cantereau, A., Garcia, M., Becq, F., and Kitzis, A.** (2004). Syntaxin 8 impairs trafficking of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and inhibits its channel activity. *J Cell Sci* 117, 1923-1935.
- Billet, A., and Hanrahan, J.W.** (2013). The secret life of CFTR as a calcium-activated chloride channel. *J Physiol.* (doi : 10.1113/jphysiol.2013.261909)
- Billet, A., Melin, P., Jollivet, M., Mornon, J.P., Callebaut, I., and Becq, F.** (2010). C terminus of nucleotide binding domain 1 contains critical features for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking and activation. *J Biol Chem* 285, 22132-22140.
- Billet, A., Luo, Y., Balghi, H., and Hanrahan, J.W.** (2013a). Role of Tyrosine Phosphorylation in the Muscarinic Activation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). *J Biol Chem* 288, 21815-21823.
- Billet, A., Mornon, J.P., Jollivet, M., Lehn, P., Callebaut, I., and Becq, F.** (2013b). CFTR: Effect of ICL2 and ICL4 amino acids in close spatial proximity on the current properties of the channel. *J Cyst Fibros.* (doi: 10.1016/j.jcf.2013.02.002)
- Bitto, E., and Cho, W.** (1998). Roles of individual domains of annexin I in its vesicle binding and vesicle aggregation: a comprehensive mutagenesis study. *Biochemistry* 37, 10231-10237.
- Bitto, E., and Cho, W.** (1999). Structural determinant of the vesicle aggregation activity of annexin I. *Biochemistry* 38, 14094-14100.
- Biwersi, J., Emans, N., and Verkman, A.S.** (1996). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation stimulates endosome fusion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12484-12489.
- Bodas, M., and Vij, N.** (2010). The NF-kappaB signaling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential. *Discov Med* 9, 346-356.
- Bode, G., Luken, A., Kerkhoff, C., Roth, J., Ludwig, S., and Nacken, W.** (2008). Interaction between S100A8/A9 and annexin A6 is involved in the calcium-induced cell surface exposition of S100A8/A9. *J Biol Chem* 283, 31776-31784.
- Boepple, P.A., Mansfield, M.J., Crawford, J.D., Crigler, J.F., Jr., Blizzard, R.M., and Crowley, W.F., Jr.** (1990). Gonadotrophin-releasing hormone agonist treatment of central precocious puberty: an analysis of growth data in a developmental context. *Acta Paediatr Scand Suppl* 367, 38-43.
- Boersma, H.H., Kietselaer, B.L., Stolk, L.M., Bennaghmouch, A., Hofstra, L., Narula, J., Heidendal, G.A., and Reutelingsperger, C.P.** (2005). Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 46, 2035-2050.
- Bohn, H., and Kraus, W.** (1979). [Isolation and characterization of a new placenta specific protein (PP10) (author's transl)]. *Arch Gynecol* 227, 125-134.

- Bomberger, J.M., Barnaby, R.L., and Stanton, B.A.** (2010). The deubiquitinating enzyme USP10 regulates the endocytic recycling of CFTR in airway epithelial cells. *Channels (Austin)* 4, 150-154.
- Bompadre, S.G., Ai, T., Cho, J.H., Wang, X., Sohma, Y., Li, M., and Hwang, T.C.** (2005a). CFTR gating I: Characterization of the ATP-dependent gating of a phosphorylation-independent CFTR channel (DeltaR-CFTR). *J Gen Physiol* 125, 361-375.
- Bompadre, S.G., Cho, J.H., Wang, X., Zou, X., Sohma, Y., Li, M., and Hwang, T.C.** (2005b). CFTR gating II: Effects of nucleotide binding on the stability of open states. *J Gen Physiol* 125, 377-394.
- Bompadre, S.G., Li, M., and Hwang, T.C.** (2008). Mechanism of G551D-CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) potentiation by a high affinity ATP analog. *J Biol Chem* 283, 5364-5369.
- Bompadre, S.G., Sohma, Y., Li, M., and Hwang, T.C.** (2007). G551D and G1349D, two CF-associated mutations in the signature sequences of CFTR, exhibit distinct gating defects. *J Gen Physiol* 129, 285-298.
- Bormann, J., Hamill, O.P., and Sakmann, B.** (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385, 243-286.
- Borroni, R., Di Blasio, A.M., Gaffuri, B., Santorsola, R., Busacca, M., Vigano, P., and Vignali, M.** (2000). Expression of GnRH receptor gene in human ectopic endometrial cells and inhibition of their proliferation by leuprolide acetate. *Mol Cell Endocrinol* 159, 37-43.
- Borthwick, L.A., Botha, P., Verdon, B., Brodrie, M.J., Gardner, A., Bourn, D., Johnson, G.E., Gray, M.A., and Fisher, A.J.** (2011). Is CFTR-deltaF508 really absent from the apical membrane of the airway epithelium? *PLoS One* 6, e23226.
- Borthwick, L.A., McGaw, J., Conner, G., Taylor, C.J., Gerke, V., Mehta, A., Robson, L., and Muimo, R.** (2007). The formation of the cAMP/protein kinase A-dependent annexin 2-S100A10 complex with cystic fibrosis conductance regulator protein (CFTR) regulates CFTR channel function. *Mol Biol Cell* 18, 3388-3397.
- Borthwick, L.A., Neal, A., Hobson, L., Gerke, V., Robson, L., and Muimo, R.** (2008a). The annexin 2-S100A10 complex and its association with TRPV6 is regulated by cAMP/PKA/CnA in airway and gut epithelia. *Cell Calcium* 44, 147-157.
- Borthwick, L.A., Riemen, C., Goddard, C., Colledge, W.H., Mehta, A., Gerke, V., and Muimo, R.** (2008b). Defective formation of PKA/CnA-dependent annexin 2-S100A10/CFTR complex in DeltaF508 cystic fibrosis cells. *Cell Signal* 20, 1073-1083.
- Bossard, F., Robay, A., Toumaniantz, G., Dahimene, S., Becq, F., Merot, J., and Gauthier, C.** (2007). NHE-RF1 protein rescues DeltaF508-CFTR function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L1085-1094.
- Boucher, R.C.** (1994a). Human airway ion transport. Part one. *Am J Respir Crit Care Med* 150, 271-281.
- Boucher, R.C.** (1994b). Human airway ion transport. Part two. *Am J Respir Crit Care Med* 150, 581-593.
- Boucher, R.C., Cheng, E.H., Paradiso, A.M., Stutts, M.J., Knowles, M.R., and Earp, H.S.** (1989). Chloride secretory response of cystic fibrosis human airway epithelia. Preservation of calcium but not protein kinase C- and A-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 84, 1424-1431.
- Bouter, A., Gounou, C., Berat, R., Tan, S., Gallois, B., Granier, T., d'Estaintot, B.L., Poschl, E., Brachvogel, B., and Brisson, A.R.** (2011). Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat Commun* 2, 270.
- Boyle, T.A., Belt-Davis, D.I., and Duello, T.M.** (1998). Nucleotide sequence analyses predict that human pituitary and human placental gonadotropin-releasing hormone receptors have identical primary structures. *Endocrine* 9, 281-287.
- Bramley, T.A., Stirling, D., Swanston, I.A., Menzies, G.S., McNeilly, A.S., and Baird, D.T.** (1987). Specific binding sites for gonadotrophin-releasing hormone, LH/chorionic gonadotrophin, low-density lipoprotein, prolactin and FSH in homogenates of human corpus luteum. II: Concentrations throughout the luteal phase of the menstrual cycle and early pregnancy. *J Endocrinol* 113, 317-327.
- Brezillon, S., Zahm, J.M., Pierrot, D., Gaillard, D., Hinnrasky, J., Millart, H., Klossek, J.M., Tummler, B., and Puchelle, E.** (1997). ATP depletion induces a loss of respiratory epithelium functional integrity and down-regulates CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) expression. *J Biol Chem* 272, 27830-27838.
- Briel, M., Greger, R., and Kunzelmann, K.** (1998). Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na⁺ channels (ENaCs) in *Xenopus* oocytes co-expressing CFTR and ENaC. *J Physiol* 508 (Pt 3), 825-836.
- Broackes-Carter, F.C., Mouchel, N., Gill, D., Hyde, S., Bassett, J., and Harris, A.** (2002). Temporal regulation of CFTR expression during ovine lung development: implications for CF gene therapy. *Hum Mol Genet* 11, 125-131.
- Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Ballmann, M., de Jonge, H.R., Laabs, U., Halley, D.J., Ellemunter, H., Mastella, G., Thomas, S., et al.** (2001). Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest* 108, 1705-1715.
- Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Ballmann, M., Greipel, J., Hundrieser, J., Halley, D.J., Laabs, U., Busche, R., De Jonge, H.R., et al.** (2000). Residual chloride secretion in intestinal tissue of deltaF508 homozygous twins and siblings with cystic fibrosis. The European CF Twin and Sibling Study Consortium. *Gastroenterology* 119, 32-40.

Brothers, S.P., Janovick, J.A., and Conn, P.M. (2006). Calnexin regulated gonadotropin-releasing hormone receptor plasma membrane expression. *J Mol Endocrinol* 37, 479-488.

Brouard, J., Knauer, N., Boelle, P.Y., Corvol, H., Henrion-Caude, A., Flamant, C., Bremont, F., Delaisi, B., Duhamel, J.F., Marguet, C., et al. (2005). Influence of interleukin-10 on *Aspergillus fumigatus* infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 191, 1988-1991.

C

Callahan, M.K., Williamson, P., and Schlegel, R.A. (2000). Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ* 7, 645-653.

Callebaut, I., Eudes, R., Mornon, J.P., and Lehn, P. (2004). Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer. *Cell Mol Life Sci* 61, 230-242.

Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., and Galletta, L.J. (2008). TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590-594.

Caohuy, H., Jozwik, C., and Pollard, H.B. (2009). Rescue of DeltaF508-CFTR by the SGK1/Nedd4-2 signaling pathway. *J Biol Chem* 284, 25241-25253.

Camors, E., Charue, D., Trouve, P., Monceau, V., Loyer, X., Russo-Marie, F., and Charlemagne, D. (2006). Association of annexin A5 with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and caveolin-3 in non-failing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 40, 47-55.

Camors, E., Monceau, V., and Charlemagne, D. (2005). Annexins and Ca²⁺ handling in the heart. *Cardiovasc Res* 65, 793-802.

Carlile, G.W., Robert, R., Zhang, D., Teske, K.A., Luo, Y., Hanrahan, J.W., and Thomas, D.Y. (2007). Correctors of protein trafficking defects identified by a novel high-throughput screening assay. *Chembiochem* 8, 1012-1020.

Carson, M.R., Winter, M.C., Travis, S.M., and Welsh, M.J. (1995). Pyrophosphate stimulates wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels. *J Biol Chem* 270, 20466-20472.

Carvalho-Oliveira, I., Efthymiadou, A., Malho, R., Nogueira, P., Tzetis, M., Kanavakis, E., Amaral, M.D., and Penque, D. (2004). CFTR localization in native airway cells and cell lines expressing wild-type or F508del-CFTR by a panel of different antibodies. *J Histochem Cytochem* 52, 193-203.

Castellani, C., Gomez Lira, M., Frulloni, L., Delmarco, A., Marzari, M., Bonizzato, A., Cavallini, G., Pignatti, P., and Mastella, G. (2001). Analysis of the entire coding region of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in idiopathic pancreatitis. *Hum Mutat* 18, 166.

Cedars, M.I., Lu, J.K., Meldrum, D.R., and Judd, H.L. (1990). Treatment of endometriosis with a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist plus medroxyprogesterone acetate. *Obstet Gynecol* 75, 641-645.

Cezanne, L., Lopez, A., Loste, F., Parnaud, G., Saurel, O., Demange, P., and Tocanne, J.F. (1999). Organization and dynamics of the proteolipid complexes formed by annexin V and lipids in planar supported lipid bilayers. *Biochemistry* 38, 2779-2786.

Chan, H.C., Kaetzel, M.A., Gotter, A.L., Dedman, J.R., and Nelson, D.J. (1994). Annexin IV inhibits calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance. A novel mechanism for ion channel regulation. *J Biol Chem* 269, 32464-32468.

Chan, K.W., Csanady, L., Seto-Young, D., Nairn, A.C., and Gadsby, D.C. (2000). Severed molecules functionally define the boundaries of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's NH(2)-terminal nucleotide binding domain. *J Gen Physiol* 116, 163-180.

Chang, S.Y., Di, A., Naren, A.P., Palfrey, H.C., Kirk, K.L., and Nelson, D.J. (2002). Mechanisms of CFTR regulation by syntaxin 1A and PKA. *J Cell Sci* 115, 783-791.

Chang, X.B., Cui, L., Hou, Y.X., Jensen, T.J., Aleksandrov, A.A., Mengos, A., and Riordan, J.R. (1999). Removal of multiple arginine-framed trafficking signals overcomes misprocessing of delta F508 CFTR present in most patients with cystic fibrosis. *Mol Cell* 4, 137-142.

Chang, X.B., Mengos, A., Hou, Y.X., Cui, L., Jensen, T.J., Aleksandrov, A., Riordan, J.R., and Gentzsch, M. (2008). Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *J Cell Sci* 121, 2814-2823.

Chanoux, R.A., and Rubenstein, R.C. (2012). Molecular Chaperones as Targets to Circumvent the CFTR Defect in Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol* 3, 137.

Chanson, M., Scerri, I., and Suter, S. (1999). Defective regulation of gap junctional coupling in cystic fibrosis pancreatic duct cells. *J Clin Invest* 103, 1677-1684.

Chanson, M., White, M.M., and Garber, S.S. (1996). cAMP promotes gap junctional coupling in T84 cells. *Am J Physiol* 271, C533-539.

Chap, H., Fauvel, J., Gassama-Diagne, A., Ragab-Thomas, J., and Simon, M.F. (1991). Une homologie frappante entre le CFTR et les annexines. *Médecine/sciences* 7, 8-9.

Chappe, F., Loewen, M.E., Hanrahan, J.W., and Chappe, V. (2008). Vasoactive intestinal peptide increases cystic fibrosis transmembrane conductance regulator levels in the apical membrane of Calu-3 cells through a protein kinase C-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 327, 226-238.

Chappe, V., Hinkson, D.A., Howell, L.D., Evagelidis, A., Liao, J., Chang, X.B., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (2004). Stimulatory and inhibitory protein kinase C consensus sequences regulate the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 390-395.

Chappe, V., Hinkson, D.A., Zhu, T., Chang, X.B., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (2003). Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J Physiol* 548, 39-52.

Charest, A., Lane, K., McMahon, K., and Housman, D.E. (2001). Association of a novel PDZ domain-containing peripheral Golgi protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptor) protein syntaxin 6. *J Biol Chem* 276, 29456-29465.

Chasan, B., Geisse, N.A., Pedatella, K., Wooster, D.G., Teintze, M., Carattino, M.D., Goldmann, W.H., and Cantiello, H.F. (2002). Evidence for direct interaction between actin and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Eur Biophys J* 30, 617-624.

Chatzaki, E., Bax, C.M., Eidne, K.A., Anderson, L., Grudzinskas, J.G., and Gallagher, C.J. (1996). The expression of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in endometrial cancer, and its relevance as an autocrine growth factor. *Cancer Res* 56, 2059-2065.

Chegini, N., Rong, H., Dou, Q., Kipersztok, S., and Williams, R.S. (1996). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3215-3221.

Chen, A., Yahalom, D., Ben-Aroya, N., Kaganovsky, E., Okon, E., and Koch, Y. (1998). A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS Lett* 435, 199-203.

Chen, A., Ganor, Y., Rahimipour, S., Ben-Aroya, N., Koch, Y., and Levite, M. (2002). The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nat Med* 8, 1421-1426.

Chen, H.F., Jeung, E.B., Stephenson, M., and Leung, P.C. (1999). Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 743-750.

Chen, J.H., Chang, X.B., Aleksandrov, A.A., and Riordan, J.R. (2002). CFTR is a monomer: biochemical and functional evidence. *J Membr Biol* 188, 55-71.

Chen, J.H., Stoltz, D.A., Karp, P.H., Ernst, S.E., Pezzulo, A.A., Moninger, T.O., Rector, M.V., Reznikov, L.R., Launspach, J.L., Chaloner, K., et al. (2010). Loss of anion transport without increased sodium absorption characterizes newborn porcine cystic fibrosis airway epithelia. *Cell* 143, 911-923.

Chen, T.Y., and Hwang, T.C. (2008). CLC-0 and CFTR: chloride channels evolved from transporters. *Physiol Rev* 88, 351-387.

Cheng, J., Cebotaru, V., Cebotaru, L., and Guggino, W.B. (2010). Syntaxin 6 and CAL mediate the degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* 21, 1178-1187.

Cheng, J., Moyer, B.D., Milewski, M., Loffing, J., Ikeda, M., Mickle, J.E., Cutting, G.R., Li, M., Stanton, B.A., and Guggino, W.B. (2002). A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J Biol Chem* 277, 3520-3529.

Cheng, J., Wang, H., and Guggino, W.B. (2004). Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J Biol Chem* 279, 1892-1898.

Cheng, J., Wang, H., and Guggino, W.B. (2005). Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and protein expression by a Rho family small GTPase TC10. *J Biol Chem* 280, 3731-3739.

Cheng, K.W., Nathwani, P.S., and Leung, P.C. (2000). Regulation of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in placental cells. *Endocrinology* 141, 2340-2349.

Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O'Riordan, C.R., and Smith, A.E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827-834.

Cheng, S.H., Rich, D.P., Marshall, J., Gregory, R.J., Welsh, M.J., and Smith, A.E. (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66, 1027-1036.

Cheon, K.W., Lee, H.S., Parhar, I.S., and Kang, I.S. (2001). Expression of the second isoform of gonadotropin-releasing hormone (GnRH-II) in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 7, 447-452.

- Cheung, K.H., Leung, C.T., Leung, G.P., and Wong, P.Y.** (2003). Synergistic effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and aquaporin-9 in the rat epididymis. *Biol Reprod* 68, 1505-1510.
- Cheung, L.W., and Wong, A.S.** (2008). Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS J* 275, 5479-5495.
- Chiang, C.H., Cheng, K.W., Igarashi, S., Nathwani, P.S., and Leung, P.C.** (2000). Hormonal regulation of estrogen receptor alpha and beta gene expression in human granulosa-luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 3828-3839.
- Childers, M., Eckel, G., Himmel, A., and Caldwell, J.** (2007). A new model of cystic fibrosis pathology: lack of transport of glutathione and its thiocyanate conjugates. *Med Hypotheses* 68, 101-112.
- Chillon, M., Casals, T., Mercier, B., Bassas, L., Lissens, W., Silber, S., Romey, M.C., Ruiz-Romero, J., Verlingue, C., Claustres, M., et al.** (1995). Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 332, 1475-1480.
- Cho, H.J., Gee, H.Y., Baek, K.H., Ko, S.K., Park, J.M., Lee, H., Kim, N.D., Lee, M.G., and Shin, I.** (2011). A small molecule that binds to an ATPase domain of Hsc70 promotes membrane trafficking of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Am Chem Soc* 133, 20267-20276.
- Choi, J.H., Gilks, C.B., Auersperg, N., and Leung, P.C.** (2006). Immunolocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and type I GnRH receptor during follicular development in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 4562-4570.
- Cholon, D.M., O'Neal, W.K., Randell, S.H., Riordan, J.R., and Gentsch, M.** (2009). Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298, L304-314.
- Choo-Kang, L.R., and Zeitlin, P.L.** (2001). Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L58-68.
- Chou, C.S., Tai, C.J., MacCalman, C.D., and Leung, P.C.** (2003a). Dose-dependent effects of gonadotropin releasing hormone on matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 and tissue specific inhibitor of metalloproteinases-1 messenger ribonucleic acid levels in human decidual Stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 680-688.
- Chou, C.S., Zhu, H., MacCalman, C.D., and Leung, P.C.** (2003b). Regulatory effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II on the levels of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in primary cultures of human extravillous cytotrophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4781-4790.
- Cihil, K.M., Ellinger, P., Fellows, A., Stolz, D.B., Madden, D.R., and Swiatecka-Urban, A.** (2012). Disabled-2 protein facilitates assembly polypeptide-2-independent recruitment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to endocytic vesicles in polarized human airway epithelial cells. *J Biol Chem* 287, 15087-15099.
- Clancy, J.P., Rowe, S.M., Accurso, F.J., Aitken, M.L., Amin, R.S., Ashlock, M.A., Ballmann, M., Boyle, M.P., Bronsveld, I., Campbell, P.W., et al.** (2011). Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* 67, 12-18.
- Claustres, M., Guittard, C., Bozon, D., Chevalier, F., Verlingue, C., Ferec, C., Girodon, E., Cazeneuve, C., Bienvenu, T., Lalau, G., et al.** (2000). Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat* 16, 143-156.
- Coakley, R.D., Grubb, B.R., Paradiso, A.M., Gatzky, J.T., Johnson, L.G., Kreda, S.M., O'Neal, W.K., and Boucher, R.C.** (2003). Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 16083-16088.
- Cobb, B.R., Fan, L., Kovacs, T.E., Sorscher, E.J., and Clancy, J.P.** (2003). Adenosine receptors and phosphodiesterase inhibitors stimulate Cl⁻ secretion in Calu-3 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 410-418.
- Coccia, M.E., Comparetto, C., Bracco, G.L., and Scarselli, G.** (2004). GnRH antagonists. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 115 Suppl 1, S44-56.
- Cohen-Tannoudji, J., Avet, C., Garrel, G., Counis, R., and Simon, V.** (2012). Decoding high Gonadotropin-releasing hormone pulsatility: a role for GnRH receptor coupling to the cAMP pathway? *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 107.
- Cohn, J.A., Melhus, O., Page, L.J., Dittrich, K.L., and Vigna, S.R.** (1991). CFTR: development of high- affinity antibodies and localization in sweat gland. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 36-43.
- Colas, J., Faure, G., Sausseureau, E., Trudel, S., Rabeh, W.M., Bitam, S., Guerrero, I.C., Fritsch, J., Sermet-Gaudelus, I., Davezac, N., et al.** (2012). Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect. *Hum Mol Genet* 21, 623-634.
- Collaco, A., Marathe, J., Kohnke, H., Kravstov, D., and Ameen, N.** (2010). Syntaxin 3 is necessary for cAMP- and cGMP-regulated exocytosis of CFTR: implications for enterotoxigenic diarrhea. *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C1450-1460.
- Collawn, J.F., Lazrak, A., Bebok, Z., and Matalon, S.** (2012). The CFTR and ENaC debate: how important is ENaC in CF lung disease? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302, L1141-1146.

Concha, N.O., Head, J.F., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R., and Seaton, B.A. (1992). Annexin V forms calcium-dependent trimeric units on phospholipid vesicles. *FEBS Lett* 314, 159-162.

Conn, P.M., Leanos-Miranda, A., and Janovick, J.A. (2002). Protein origami: therapeutic rescue of misfolded gene products. *Mol Interv* 2, 308-316.

Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.

Cornet-Boyaka, E., Di, A., Chang, S.Y., Naren, A.P., Tousson, A., Nelson, D.J., and Kirk, K.L. (2002). CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12477-12482.

Corvol, H., Boelle, P.Y., Brouard, J., Knauer, N., Chadelat, K., Henrion-Caude, A., Flamant, C., Muselet-Charlier, C., Boule, M., Fauroux, B., et al. (2008). Genetic variations in inflammatory mediators influence lung disease progression in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 43, 1224-1232.

Counis, R., Garrel, G., Laverriere, J.N., Simon, V., Bleux, C., Magre, S., and Cohen-Tannoudji, J. (2009). The GnRH receptor and the response of gonadotrope cells to GnRH pulse frequency code. A story of an atypical adaptation of cell function relying on a lack of receptor homologous desensitization. *Folia Histochem Cytobiol* 47, S81-87.

Crawford, I., Maloney, P.C., Zeitlin, P.L., Guggino, W.B., Hyde, S.C., Turley, H., Gatter, K.C., Harris, A., and Higgins, C.F. (1991). Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9262-9266.

Crawford, R.M., Treharne, K.J., Best, O.G., Muimo, R., Riemen, C.E., and Mehta, A. (2005). A novel physical and functional association between nucleoside diphosphate kinase A and AMP-activated protein kinase alpha1 in liver and lung. *Biochem J* 392, 201-209.

Crawford, R.M., Treharne, K.J., Best, O.G., Riemen, C.E., Muimo, R., Gruenert, D.C., Arnaud-Dabernat, S., Daniel, J.Y., and Mehta, A. (2006). NDPK-A (but not NDPK-B) and AMPK alpha1 (but not AMPK alpha2) bind the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell membranes. *Cell Signal* 18, 1595-1603.

Creutz, C.E. (1992). The annexins and exocytosis. *Science* 258, 924-931.

Creutz, C.E., Dowling, L.G., Sando, J.J., Villar-Palasi, C., Whipple, J.H., and Zaks, W.J. (1983). Characterization of the chromobindins. Soluble proteins that bind to the chromaffin granule membrane in the presence of Ca²⁺. *J Biol Chem* 258, 14664-14674.

Creutz, C.E., Pazoles, C.J., and Pollard, H.B. (1978). Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. *J Biol Chem* 253, 2858-2866.

Creutz, C.E., Pazoles, C.J., and Pollard, H.B. (1979). Self-association of synexin in the presence of calcium. Correlation with synexin-induced membrane fusion and examination of the structure of synexin aggregates. *J Biol Chem* 254, 553-558.

Crompton, M.R., Moss, S.E., and Crumpton, M.J. (1988). Diversity in the lipocortin/calpactin family. *Cell* 55, 1-3.

Csanady, L., Chan, K.W., Seto-Young, D., Kopsco, D.C., Nairn, A.C., and Gadsby, D.C. (2000). Severed channels probe regulation of gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by its cytoplasmic domains. *J Gen Physiol* 116, 477-500.

Csanady, L., Seto-Young, D., Chan, K.W., Cenciarelli, C., Angel, B.B., Qin, J., McLachlin, D.T., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., Nairn, A.C., et al. (2005). Preferential phosphorylation of R-domain Serine 768 dampens activation of CFTR channels by PKA. *J Gen Physiol* 125, 171-186.

Cui, G., Zhang, Z.R., O'Brien, A.R., Song, B., and McCarty, N.A. (2008). Mutations at arginine 352 alter the pore architecture of CFTR. *J Membr Biol* 222, 91-106.

Cui, L., Aleksandrov, L., Chang, X.B., Hou, Y.X., He, L., Hegedus, T., Gentzsch, M., Aleksandrov, A., Balch, W.E., and Riordan, J.R. (2007). Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR. *J Mol Biol* 365, 981-994.

Currie, A.J., Fraser, H.M., and Sharpe, R.M. (1981). Human placental receptors for luteinizing hormone releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 99, 332-338.

Cushing, P.R., Fellows, A., Villone, D., Boisguerin, P., and Madden, D.R. (2008). The relative binding affinities of PDZ partners for CFTR: a biochemical basis for efficient endocytic recycling. *Biochemistry* 47, 10084-10098.

Cutting, G.R. (2005). Modifier genetics: cystic fibrosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 237-260.

Cutting, G.R., Kasch, L.M., Rosenstein, B.J., Zielenski, J., Tsui, L.C., Antonarakis, S.E., and Kazazian, H.H., Jr. (1990). A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. *Nature* 346, 366-369.

D

Dachary-Prigent, J., Freyssinet, J.M., Pasquet, J.M., Carron, J.C., and Nurden, A.T. (1993). Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood* 81, 2554-2565.

- Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R.G., Pavirani, A., Lecocq, J.P., and Lazdunski, M.** (1991). Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 354, 526-528.
- Dalli, J., Rosignoli, G., Hayhoe, R.P., Edelman, A., and Perretti, M.** (2010). CFTR inhibition provokes an inflammatory response associated with an imbalance of the annexin A1 pathway. *Am J Pathol* 177, 176-186.
- Daub, H., Weiss, F.U., Wallasch, C., and Ullrich, A.** (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.
- Davidson, J.S., Flanagan, C.A., Zhou, W., Becker, II, Elario, R., Emeran, W., Sealfon, S.C., and Millar, R.P.** (1995). Identification of N-glycosylation sites in the gonadotropin-releasing hormone receptor: role in receptor expression but not ligand binding. *Mol Cell Endocrinol* 107, 241-245.
- Davies, J.C., Alton, E.W., and Bush, A.** (2007). Cystic fibrosis. *BMJ* 335, 1255-1259.
- Davis, P.B.** (2006). Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 475-482.
- Dawson, R.J., and Locher, K.P.** (2007). Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett* 581, 935-938.
- De Boeck, K., Wilschanski, M., Castellani, C., Taylor, C., Cuppens, H., Dodge, J., and Sinaasappel, M.** (2006). Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 61, 627-635.
- De Keukeleire, B., Micoud, J., Biard, J., and Benharouga, M.** (2008). Endoplasmic reticulum-associated degradation of mutant CFTR requires a guanine nucleotide-sensitive step. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1729-1742.
- Dean, M., and Annilo, T.** (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 123-142.
- Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G.** (2001a). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42, 1007-1017.
- Dean, M., Rzhetsky, A., and Allikmets, R.** (2001b). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11, 1156-1166.
- Deber, C.M., Cheung, J.C., and Rath, A.** (2008). Defining the defect in F508 del CFTR: a soluble problem? *Chem Biol* 15, 3-4.
- Delacourt, C.** (2003). [Inflammation and cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* 10 Suppl 2, 338s-341s.
- Della Gaspera, B., Weinman, S., Huber, C., Lemnaouar, M., Paul, A., Picard, J., and Gruenert, D.C.** (1995). Overexpression of annexin V in cystic fibrosis epithelial cells from fetal trachea. *Exp Cell Res* 219, 379-383.
- Denning, C.R., Sommers, S.C., and Quigley, H.J., Jr.** (1968). Infertility in male patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* 41, 7-17.
- Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E., and Welsh, M.J.** (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358, 761-764.
- Densmore, V.S., and Urbanski, H.F.** (2003). Relative effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II on gonadotropin release. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2126-2134.
- Dequeker, E., Stuhmann, M., Morris, M.A., Casals, T., Castellani, C., Claustres, M., Cuppens, H., des Georges, M., Ferec, C., Macek, M., et al.** (2009). Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 17, 51-65.
- Deterding, R., Retsch-Bogart, G., Milgram, L., Gibson, R., Daines, C., Zeitlin, P.L., Milla, C., Marshall, B., Lavange, L., Engels, J., et al.** (2005). Safety and tolerability of denufosal tetrasodium inhalation solution, a novel P2Y2 receptor agonist: results of a phase 1/phase 2 multicenter study in mild to moderate cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 39, 339-348.
- Devaux, P.F.** (1991). Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30, 1163-1173.
- Devor, D.C., Singh, A.K., Lambert, L.C., DeLuca, A., Frizzell, R.A., and Bridges, R.J.** (1999). Bicarbonate and chloride secretion in Calu-3 human airway epithelial cells. *J Gen Physiol* 113, 743-760.
- Di, A., Brown, M.E., Deriy, L.V., Li, C., Szeto, F.L., Chen, Y., Huang, P., Tong, J., Naren, A.P., Bindokas, V., et al.** (2006). CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* 8, 933-944.
- Dierschke, D.J., Bhattacharya, A.N., Atkinson, L.E., and Knobil, E.** (1970). Circoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 87, 850-853.
- Di Sant'Agnese, P.A., Darling, R.C., Perera, G.A., and Shea, E.** (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12, 549-563.
- Dobkin-Bekman, M., Naidich, M., Pawson, A.J., Millar, R.P., Seger, R., and Naor, Z.** (2006). Activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) by GnRH is cell-context dependent. *Mol Cell Endocrinol* 252, 184-190.

- Dolan, S., Evans, N.P., Richter, T.A., and Nolan, A.M.** (2003). Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor in sheep spinal cord. *Neurosci Lett* 346, 120-122.
- Domingo-Ribas, C., and Bosque-Garcia, M.** (2006). [Nasal potential difference test to diagnose cystic fibrosis]. *Arch Bronconeumol* 42, 33-38.
- 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, 637-668.
- Dondi, D., Limonta, P., Moretti, R.M., Marelli, M.M., Garattini, E., and Motta, M.** (1994). Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on human androgen-independent prostate cancer cell line DU 145: evidence for an autocrine-inhibitory LHRH loop. *Cancer Res* 54, 4091-4095.
- Dormer, R.L., McNeilly, C.M., Morris, M.R., Pereira, M.M., Doull, I.J., Becq, F., Mettey, Y., Vierfond, J.M., and McPherson, M.A.** (2001). Localisation of wild-type and DeltaF508-CFTR in nasal epithelial cells. *Pflugers Arch* 443 Suppl 1, S117-120.
- Dorwart, M.R., Shcheynikov, N., Wang, Y., Stippec, S., and Muallem, S.** (2007). SLC26A9 is a Cl(-) channel regulated by the WNK kinases. *J Physiol* 584, 333-345.
- Dousmanis, A.G., Nairn, A.C., and Gadsby, D.C.** (2002). Distinct Mg(2+)-dependent steps rate limit opening and closing of a single CFTR Cl(-) channel. *J Gen Physiol* 119, 545-559.
- Dransfield, D.T., Bradford, A.J., Smith, J., Martin, M., Roy, C., Mangeat, P.H., and Goldenring, J.R.** (1997). Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *EMBO J* 16, 35-43.
- Drumm, M.L., Konstan, M.W., Schluchter, M.D., Handler, A., Pace, R., Zou, F., Zariwala, M., Fargo, D., Xu, A., Dunn, J.M., et al.** (2005). Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 353, 1443-1453.
- Drumm, M.L., Pope, H.A., Cliff, W.H., Rommens, J.M., Marvin, S.A., Tsui, L.C., Collins, F.S., Frizzell, R.A., and Wilson, J.M.** (1990). Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62, 1227-1233.
- Drumm, M.L., Wilkinson, D.J., Smit, L.S., Worrell, R.T., Strong, T.V., Frizzell, R.A., Dawson, D.C., and Collins, F.S.** (1991). Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254, 1797-1799.
- Du, K., and Lukacs, G.L.** (2009). Cooperative assembly and misfolding of CFTR domains in vivo. *Mol Biol Cell* 20, 1903-1915.
- Du, K., Sharma, M., and Lukacs, G.L.** (2005). The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol* 12, 17-25.
- Dubois, T., Mira, J.P., Feliers, D., Solito, E., Russo-Marie, F., and Oudinet, J.P.** (1998). Annexin V inhibits protein kinase C activity via a mechanism of phospholipid sequestration. *Biochem J* 330 (Pt 3), 1277-1282.
- Dubois, T., Oudinet, J.P., Russo-Marie, F., and Rothhut, B.** (1995). In vivo and in vitro phosphorylation of annexin II in T cells: potential regulation by annexin V. *Biochem J* 310 (Pt 1), 243-248.
- Dulhanty, A.M., and Riordan, J.R.** (1994). A two-domain model for the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator based on sequence similarities. *FEBS Lett* 343, 109-114.
- Dumur, V., Gervais, R., Rigot, J.M., Delomel-Vinner, E., Lafitte, J.J., and Roussel, P.** (1995). Congenital bilateral absence of vas deferens in absence of cystic fibrosis. *Lancet* 345, 200-201.
- Dumur, V., Gervais, R., Rigot, J.M., Lafitte, J.J., Manouvrier, S., Biserte, J., Mazeman, E., and Roussel, P.** (1990). Abnormal distribution of CF delta F508 allele in azoospermic men with congenital aplasia of epididymis and vas deferens. *Lancet* 336, 512.

E

- Ea, H.K., Monceau, V., Camors, E., Cohen-Solal, M., Charlemagne, D., and Liote, F.** (2008). Annexin 5 overexpression increased articular chondrocyte apoptosis induced by basic calcium phosphate crystals. *Ann Rheum Dis* 67, 1617-1625.
- Eberhard, D.A., Karns, L.R., VandenBerg, S.R., and Creutz, C.E.** (2001). Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding. *J Cell Sci* 114, 3155-3166.
- Eckford, P.D., Li, C., Ramjeesingh, M., and Bear, C.E.** (2012). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J Biol Chem* 287, 36639-36649.
- Edelman, A., and Fritsch, J.** (2005). Différents aspects de régulation du transport ionique transépithélial dans le contexte de la mucoviscidose. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. Volume 8, Numéro 3, 135-49
- Egan, M., Flotte, T., Afione, S., Solow, R., Zeitlin, P.L., Carter, B.J., and Guggino, W.B.** (1992). Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* 358, 581-584.

Egan, M.E., Glockner-Pagel, J., Ambrose, C., Cahill, P.A., Pappoe, L., Balamuth, N., Cho, E., Canny, S., Wagner, C.A., Geibel, J., et al. (2002). Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat Med* 8, 485-492.

Egan, M.E., Pearson, M., Weiner, S.A., Rajendran, V., Rubin, D., Glockner-Pagel, J., Canny, S., Du, K., Lukacs, G.L., and Caplan, M.J. (2004). Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 304, 600-602.

Eggermont, E., and De Boeck, K. (1991). Small-intestinal abnormalities in cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr* 150, 824-828.

Eidelman, O., BarNoy, S., Razin, M., Zhang, J., McPhie, P., Lee, G., Huang, Z., Sorscher, E.J., and Pollard, H.B. (2002). Role for phospholipid interactions in the trafficking defect of Delta F508-CFTR. *Biochemistry* 41, 11161-11170.

Eidne, K.A., Flanagan, C.A., and Millar, R.P. (1985). Gonadotropin-releasing hormone binding sites in human breast carcinoma. *Science* 229, 989-991.

Emons, G., Muller, V., Ortmann, O., and Schulz, K.D. (1998). Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65, 199-206.

Emons, G., Ortmann, O., Schulz, K.D., and Schally, A.V. (1997). Growth-inhibitory actions of analogues of Luteinizing Hormone Releasing Hormone on tumor cells. *Trends Endocrinol Metab* 8, 355-362.

Emons, G., Schroder, B., Ortmann, O., Westphalen, S., Schulz, K.D., and Schally, A.V. (1993). High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 1458-1464.

Emons, G., and Schally, A.V. (1994). The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod* 9, 1364-1379.

Engelhardt, J.F., Yankaskas, J.R., Ernst, S.A., Yang, Y., Marino, C.R., Boucher, R.C., Cohn, J.A., and Wilson, J.M. (1992). Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet* 2, 240-248.

Enuka, Y., Hanukoglu, I., Edelheit, O., Vaknine, H., and Hanukoglu, A. (2012). Epithelial sodium channels (ENaC) are uniformly distributed on motile cilia in the oviduct and the respiratory airways. *Histochem Cell Biol* 137, 339-353.

F

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.

Falcone, T., Falutz, G., and Tolis, G. (1982). LH-RH-endocrine manipulation in cancer of the prostate. *Biomed Pharmacother* 36, 344-348.

Fan, X., Krahling, S., Smith, D., Williamson, P., and Schlegel, R.A. (2004). Macrophage surface expression of annexins I and II in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes. *Mol Biol Cell* 15, 2863-2872.

Fanconi, G., Uehlinger, E., Knauer, C. (1936). Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wien Med Wschr* 86, 753-756.

Fanelli, T., Cardone, R.A., Favia, M., Guerra, L., Zaccolo, M., Monterisi, S., De Santis, T., Riccardi, S.M., Reshkin, S.J., and Casavola, V. (2008). Beta-oestradiol rescues DeltaF508CFTR functional expression in human cystic fibrosis airway CFBE41o- cells through the up-regulation of NHERF1. *Biol Cell* 100, 399-412.

Fang, Y.T., Lin, C.F., Wang, C.Y., Anderson, R., and Lin, Y.S. (2011). Interferon-gamma stimulates p11-dependent surface expression of annexin A2 in lung epithelial cells to enhance phagocytosis. *J Cell Physiol* 227, 2775-2787.

Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (1999). Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol* 11, 432-439.

Farber, S. (1943). Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome. *N Engl J Med* 229, 653-682.

Faria, D., Dahimene, S., Alessio, L., Scott-Ward, T., Schreiber, R., Kunzelmann, K., and Amaral, M.D. (2010). Effect of Annexin A5 on CFTR: regulated traffic or scaffolding? *Mol Membr Biol* 28, 14-29.

Farinha, C.M., and Amaral, M.D. (2005). Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol Cell Biol* 25, 5242-5252.

Farinha, C.M., Nogueira, P., Mendes, F., Penque, D., and Amaral, M.D. (2002). The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem J* 366, 797-806.

Farriau, J.P. (2002). [Neonatal screening for cystic fibrosis: a new screening program and a new challenge]. *Ann Biol Clin (Paris)* 60, 13-14.

Farrioux, J.P., Vidailhet, M., Briard, M.L., Belot, V., and Dhondt, J.L. (2003). Neonatal screening for cystic fibrosis: France rises to the challenge. *J Inherit Metab Dis* 26, 729-744.

Fatehi, M., and Linsdell, P. (2009). Novel residues lining the CFTR chloride channel pore identified by functional modification of introduced cysteines. *J Membr Biol* 228, 151-164.

Favia, M., Guerra, L., Fanelli, T., Cardone, R.A., Monterisi, S., Di Sole, F., Castellani, S., Chen, M., Seidler, U., Reshkin, S.J., et al. (2010). Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human airway CFBE41o- cells. *Mol Biol Cell* 21, 73-86.

Fekete, M., Zalatnai, A., Comaru-Schally, A.M., and Schally, A.V. (1989). Membrane receptors for peptides in experimental and human pancreatic cancers. *Pancreas* 4, 521-528.

Ferec, C., Casals, T., Chuzhanova, N., Macek, M., Jr., Bienvenu, T., Holubova, A., King, C., McDevitt, T., Castellani, C., Farrell, P.M., et al. (2006). Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet* 14, 567-576.

Ferec, C., Scotet, V., Beucher, J., and Corvol, H. [Genetics and modifier genes, atypical and rare forms]. *Arch Pediatr* 19 Suppl 1, S3-7.

Fiedler, K., Lafont, F., Parton, R.G., and Simons, K. (1995). Annexin XIIIb: a novel epithelial specific annexin is implicated in vesicular traffic to the apical plasma membrane. *J Cell Biol* 128, 1043-1053.

Filipenko, N.R., Kang, H.M., and Waisman, D.M. (2000). Characterization of the Ca²⁺-binding sites of annexin II tetramer. *J Biol Chem* 275, 38877-38884.

Filipenko, N.R., and Waisman, D.M. (2001). The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem* 276, 5310-5315.

Flower, R.J. (1986). Background and discovery of lipocortins. *Agents Actions* 17, 255-262.

Foufelle, F., and Ferre, P. (2007). [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)* 23, 291-296.

Funakoshi, T., Heimark, R.L., Hendrickson, L.E., McMullen, B.A., and Fujikawa, K. (1987). Human placental anticoagulant protein: isolation and characterization. *Biochemistry* 26, 5572-5578.

Furr, B.J., and Nicholson, R.I. (1982). Use of analogues of luteinizing hormone-releasing hormone for the treatment of cancer. *J Reprod Fertil* 64, 529-539.

Futter, C.E., Felder, S., Schlessinger, J., Ullrich, A., and Hopkins, C.R. (1993). Annexin I is phosphorylated in the multivesicular body during the processing of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 120, 77-83.

French, P.J., Bijman, J., Bot, A.G., Boomaars, W.E., Scholte, B.J., and de Jonge, H.R. (1997). Genistein activates CFTR Cl⁻ channels via a tyrosine kinase- and protein phosphatase-independent mechanism. *Am J Physiol* 273, C747-753.

Frizzell, R.A., and Hanrahan, J.W. (2012). Physiology of epithelial chloride and fluid secretion. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a009563.

Frizzell, R.A., Reckemmer, G., and Shoemaker, R.L. (1986). Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. *Science* 233, 558-560.

Fu, L., Rab, A., Tang, L.P., Rowe, S.M., Bebok, Z., and Collawn, J.F. (2012). Dab2 is a key regulator of endocytosis and post-endocytic trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem J* 441, 633-643.

Fuller, W., and Cuthbert, A.W. (2000). Post-translational disruption of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-molecular chaperone complex with geldanamycin stabilizes delta F508 CFTR in the rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 275, 37462-37468.

G

Gabriel, S.E., Clarke, L.L., Boucher, R.C., and Stutts, M.J. (1993). CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363, 263-268.

Gadsby, D.C., and Nairn, A.C. (1999a). Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev* 79, S77-S107.

Gadsby, D.C., and Nairn, A.C. (1999b). Regulation of CFTR Cl⁻ ion channels by phosphorylation and dephosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33, 79-106.

Gadsby, D.C., Vergani, P., and Csanady, L. (2006). The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440, 477-483.

- Gaetje, R.** (1994). Influence of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) and a GnRH-agonist on granulosa cell steroidogenesis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 21, 164-169.
- Gaillard, D.A., Carre-Pigeon, F., and Lallemand, A.** (1997). Normal vas deferens in fetuses with cystic fibrosis. *J Urol* 158, 1549-1552.
- Galiotta, L.J., Springsteel, M.F., Eda, M., Niedzinski, E.J., By, K., Haddadin, M.J., Kurth, M.J., Nantz, M.H., and Verkman, A.S.** (2001). Novel CFTR chloride channel activators identified by screening of combinatorial libraries based on flavone and benzoquinolinium lead compounds. *J Biol Chem* 276, 19723-19728.
- Ganeshan, R., Nowotarski, K., Di, A., Nelson, D.J., and Kirk, K.L.** (2007). CFTR surface expression and chloride currents are decreased by inhibitors of N-WASP and actin polymerization. *Biochim Biophys Acta* 1773, 192-200.
- Garrel, G., Lerrant, Y., Siriostis, C., Berault, A., Magre, S., Bouchaud, C., and Counis, R.** (1998). Evidence that gonadotropin-releasing hormone stimulates gene expression and levels of active nitric oxide synthase type I in pituitary gonadotrophs, a process altered by desensitization and, indirectly, by gonadal steroids. *Endocrinology* 139, 2163-2170.
- Garty, H., and Palmer, L.G.** (1997). Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77, 359-396.
- Ge, N., Muise, C.N., Gong, X., and Linsdell, P.** (2004). Direct comparison of the functional roles played by different transmembrane regions in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Biol Chem* 279, 55283-55289.
- Gee, H.Y., Noh, S.H., Tang, B.L., Kim, K.H., and Lee, M.G.** (2011). Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell* 146, 746-760.
- Gee, H.Y., Tang, B.L., Kim, K.H., and Lee, M.G.** (2010). Syntaxin 16 binds to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and regulates its membrane trafficking in epithelial cells. *J Biol Chem* 285, 35519-35527.
- Geisow, M.J.** (1986). Common domain structure of Ca²⁺ and lipid-binding proteins. *FEBS Lett* 203, 99-103.
- Genge, B.R., Wu, L.N., and Wuthier, R.E.** (1990). Differential fractionation of matrix vesicle proteins. Further characterization of the acidic phospholipid-dependent Ca²⁺-binding proteins. *J Biol Chem* 265, 4703-4710.
- Gentsch, M., Chang, X.B., Cui, L., Wu, Y., Ozols, V.V., Choudhury, A., Pagano, R.E., and Riordan, J.R.** (2004). Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* 15, 2684-2696.
- Gentsch, M., Dang, H., Dang, Y., Garcia-Caballero, A., Suchindran, H., Boucher, R.C., and Stutts, M.J.** (2010). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impedes proteolytic stimulation of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* 285, 32227-32232.
- Gerke, V., Creutz, C.E., and Moss, S.E.** (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 449-461.
- Gerke, V., and Moss, S.E.** (1997). Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1357, 129-154.
- Gerke, V., and Moss, S.E.** (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82, 331-371.
- Gibson, L.E., and Cooke, R.E.** (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23, 545-549.
- Gidon-Jeangirard, C., Hugel, B., Holl, V., Toti, F., Laplanche, J.L., Meyer, D., and Freyssinet, J.M.** (1999). Annexin V delays apoptosis while exerting an external constraint preventing the release of CD4⁺ and PrPc⁺ membrane particles in a human T lymphocyte model. *J Immunol* 162, 5712-5718.
- Girard, C., Tinel, N., Terrenoire, C., Romey, G., Lazdunski, M., and Borsotto, M.** (2002). p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K⁺ channel, TASK-1. *EMBO J* 21, 4439-4448.
- Girodon, E., Cazeneuve, C., Lebagry, F., Chinet, T., Costes, B., Ghanem, N., Martin, J., Lemay, S., Scheid, P., Housset, B., et al.** (1997). CFTR gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Eur J Hum Genet* 5, 149-155.
- Glenney, J.R., Jr., Tack, B., and Powell, M.A.** (1987). Calpactins: two distinct Ca⁺⁺-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. *J Cell Biol* 104, 503-511.
- Glozman, R., Okiyoneda, T., Mulvihill, C.M., Rini, J.M., Barriere, H., and Lukacs, G.L.** (2009). N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 184, 847-862.
- Gomes-Alves, P., Couto, F., Pesquita, C., Coelho, A.V., and Penque, D.** (2010). Rescue of F508del-CFTR by RXR motif inactivation triggers proteome modulation associated with the unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta* 1804, 856-865.
- Gore, A.C., and Roberts, J.L.** (1997). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro. *Front Neuroendocrinol* 18, 209-245.
- Granger, A., Ngo-Muller, V., Bleux, C., Guigon, C., Pincas, H., Magre, S., Daegelen, D., Tixier-Vidal, A., Counis, R., and Laverriere, J.N.** (2004). The promoter of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor gene directs the expression of the human placental alkaline phosphatase reporter gene in gonadotrope cells in the anterior pituitary gland as well as in multiple extrapituitary tissues. *Endocrinology* 145, 983-993.

- Grasemann, H., Stehling, F., Brunar, H., Widmann, R., Laliberte, T.W., Molina, L., Doring, G., and Ratjen, F.** (2007). Inhalation of Moli1901 in patients with cystic fibrosis. *Chest* 131, 1461-1466.
- Grasso, G., Massai, L., De Leo, V., and Muscettola, M.** (1998). The effect of LHRH and TRH on human interferon-gamma production in vivo and in vitro. *Life Sci* 62, 2005-2014.
- Gray, M.A.** (2004). Bicarbonate secretion: it takes two to tango. *Nat Cell Biol* 6, 292-294.
- Gray, M.A., Pollard, C.E., Harris, A., Coleman, L., Greenwell, J.R., and Argent, B.E.** (1990). Anion selectivity and block of the small-conductance chloride channel on pancreatic duct cells. *Am J Physiol* 259, C752-761.
- Griesenbach, U., and Alton, E.W.** (2012). Progress in gene and cell therapy for cystic fibrosis lung disease. *Curr Pharm Des* 18, 642-662.
- Grieve, A.G., Moss, S.E., and Hayes, M.J.** (2012). Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization. *Int J Cell Biol* 2012, 852430.
- Grosse, R., Schmid, A., Schoneberg, T., Herrlich, A., Muhn, P., Schultz, G., and Gudermann, T.** (2000). Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G(q/11) proteins. *J Biol Chem* 275, 9193-9200.
- Grove, D.E., Rosser, M.F., Ren, H.Y., Naren, A.P., and Cyr, D.M.** (2009). Mechanisms for rescue of correctable folding defects in CFTRDelta F508. *Mol Biol Cell* 20, 4059-4069.
- Gründker, C., Volker, P., and Emons, G.** (2001). Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(l)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 142, 2369-2380.
- Guerra, L., Fanelli, T., Favia, M., Riccardi, S.M., Busco, G., Cardone, R.A., Carrabino, S., Weinman, E.J., Reshkin, S.J., Conese, M., et al.** (2005). Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor isoform 1 overexpression modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression and activity in human airway 16HBE14o- cells and rescues DeltaF508 CFTR functional expression in cystic fibrosis cells. *J Biol Chem* 280, 40925-40933.
- Guerrero, H.E., Stein, P., Asch, R.H., de Fried, E.P., and Tesone, M.** (1993). Effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in ovarian cells. *Fertil Steril* 59, 803-808.
- Guggino, W.B., and Stanton, B.A.** (2006). New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 426-436.
- Gunderson, K.L., and Kopito, R.R.** (1994). Effects of pyrophosphate and nucleotide analogs suggest a role for ATP hydrolysis in cystic fibrosis transmembrane regulator channel gating. *J Biol Chem* 269, 19349-19353.
- Gunderson, K.L., and Kopito, R.R.** (1995). Conformational states of CFTR associated with channel gating: the role ATP binding and hydrolysis. *Cell* 82, 231-239.
- Guzman-Soto, I., Salinas, E., Hernandez-Jasso, I., and Quintanar, J.L.** (2012). Leuprolide Acetate, a GnRH Agonist, Improves Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: A Possible Therapy for Multiple Sclerosis. *Neurochem Res* 37, 2190-2197.

H

- Haardt, M., Benharouga, M., Lechardeur, D., Kartner, N., and Lukacs, G.L.** (1999). C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 274, 21873-21877.
- Haggie, P.M., and Verkman, A.S.** (2008). Monomeric CFTR in plasma membranes in live cells revealed by single molecule fluorescence imaging. *J Biol Chem* 283, 23510-23513.
- Hajjar, K.A., and Krishnan, S.** (1999). Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med* 9, 128-138.
- Hallows, K.R.** (2005). Emerging role of AMP-activated protein kinase in coupling membrane transport to cellular metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14, 464-471.
- Hallows, K.R., Kobinger, G.P., Wilson, J.M., Witters, L.A., and Foskett, J.K.** (2003a). Physiological modulation of CFTR activity by AMP-activated protein kinase in polarized T84 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C1297-1308.
- Hallows, K.R., McCane, J.E., Kemp, B.E., Witters, L.A., and Foskett, J.K.** (2003b). Regulation of channel gating by AMP-activated protein kinase modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in lung submucosal cells. *J Biol Chem* 278, 998-1004.
- Hallows, K.R., Raghuram, V., Kemp, B.E., Witters, L.A., and Foskett, J.K.** (2000). Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J Clin Invest* 105, 1711-1721.

- Handelsman, D.J., and Swerdloff, R.S.** (1986). Pharmacokinetics of gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Endocr Rev* 7, 95-105.
- Hapgood, J.P., Sadie, H., van Biljon, W., and Ronacher, K.** (2005). Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes. *J Neuroendocrinol* 17, 619-638.
- Harada, K., Okiyoned, T., Hashimoto, Y., Ueno, K., Nakamura, K., Yamahira, K., Sugahara, T., Shuto, T., Wada, I., Suico, M.A., et al.** (2006). Calreticulin negatively regulates the cell surface expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 281, 12841-12848.
- Harder, T., Kellner, R., Parton, R.G., and Gruenberg, J.** (1997). Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 8, 533-545.
- Harris, A., Chalkley, G., Goodman, S., and Coleman, L.** (1991). Expression of the cystic fibrosis gene in human development. *Development* 113, 305-310.
- Harris, B.Z., and Lim, W.A.** (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114, 3219-3231.
- Harris, G.W.** (1950). Oestrous rhythm. Pseudopregnancy and the pituitary stalk in the rat. *J Physiol* 111, 347-360.
- Hartzell, C., Putzier, I., and Arreola, J.** (2005). Calcium-activated chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67, 719-758.
- Haws, C.M., Nepomuceno, I.B., Krouse, M.E., Wakelee, H., Law, T., Xia, Y., Nguyen, H., and Wine, J.J.** (1996). Delta F508-CFTR channels: kinetics, activation by forskolin, and potentiation by xanthines. *Am J Physiol* 270, C1544-1555.
- Hayashi, J., Liu, P., Ferguson, S.E., Wen, M., Sakata, T., Teraoka, H., and Riley, H.D., 3rd** (1993). Arachidonic acid metabolism in cells transfected with sense and anti-sense cDNA to annexin I. *Biochem Mol Biol Int* 31, 143-151.
- Hayes, M.J., and Moss, S.E.** (2004). Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1166-1170. (Rand, 2000)
- Hayes, M.J., Rescher, U., Gerke, V., and Moss, S.E.** (2004). Annexin-actin interactions. *Traffic* 5, 571-576.
- Hayflick, J.S., Adelman, J.P., and Seeburg, P.H.** (1989). The complete nucleotide sequence of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *Nucleic Acids Res* 17, 6403-6404.
- He, L., Aleksandrov, A.A., Serohijos, A.W., Hegedus, T., Aleksandrov, L.A., Cui, L., Dokholyan, N.V., and Riordan, J.R.** (2008). Multiple membrane-cytoplasmic domain contacts in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mediate regulation of channel gating. *J Biol Chem* 283, 26383-26390.
- He, L., Aleksandrov, L.A., Cui, L., Jensen, T.J., Nesbitt, K.L., and Riordan, J.R.** (2010). Restoration of domain folding and interdomain assembly by second-site suppressors of the DeltaF508 mutation in CFTR. *FASEB J* 24, 3103-3112.
- Heda, G.D., Tanwani, M., and Marino, C.R.** (2001). The Delta F508 mutation shortens the biochemical half-life of plasma membrane CFTR in polarized epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C166-174.
- Hegedus, T., Aleksandrov, A., Cui, L., Gentzsch, M., Chang, X.B., and Riordan, J.R.** (2006). F508del CFTR with two altered RXR motifs escapes from ER quality control but its channel activity is thermally sensitive. *Biochim Biophys Acta* 1758, 565-572.
- Hegedus, T., Aleksandrov, A., Mengos, A., Cui, L., Jensen, T.J., and Riordan, J.R.** (2009). Role of individual R domain phosphorylation sites in CFTR regulation by protein kinase A. *Biochim Biophys Acta* 1788, 1341-1349.
- Hegedus, T., Serohijos, A.W., Dokholyan, N.V., He, L., and Riordan, J.R.** (2008). Computational studies reveal phosphorylation-dependent changes in the unstructured R domain of CFTR. *J Mol Biol* 378, 1052-1063.
- Hegedus, T., Sessler, T., Scott, R., Thelin, W., Bakos, E., Varadi, A., Szabo, K., Homolya, L., Milgram, S.L., and Sarkadi, B.** (2003). C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 454-461.
- Helenius, A., and Aebi, M.** (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.
- Helenius, A., and Aebi, M.** (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-1049.
- Hentze, M.W., and Kulozik, A.E.** (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96, 307-310.
- Herrmann, U., Dockter, G., and Lammert, F.** (2010). Cystic fibrosis-associated liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24, 585-592.
- Higgins, C.F.** (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8, 67-113.
- Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., Holland, I.B., Gray, L., Buckel, S.D., Bell, A.W., et al.** (1986). A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323, 448-450.

Hillian, A.D., Londono, D., Dunn, J.M., Goddard, K.A., Pace, R.G., Knowles, M.R., and Drumm, M.L. (2008). Modulation of cystic fibrosis lung disease by variants in interleukin-8. *Genes Immun* 9, 501-508.

Hirata, F., Thibodeau, L.M., and Hirata, A. (2010). Ubiquitination and SUMOylation of annexin A1 and helicase activity. *Biochim Biophys Acta* 1800, 899-905.

Hislop, J.N., Madziva, M.T., Everest, H.M., Harding, T., Uney, J.B., Willars, G.B., Millar, R.P., Troskie, B.E., Davidson, J.S., and McArdle, C.A. (2000). Desensitization and internalization of human and xenopus gonadotropin-releasing hormone receptors expressed in alphaT4 pituitary cells using recombinant adenovirus. *Endocrinology* 141, 4564-4575.

Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V., and Hebert, S.C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362, 31-38.

Holsclaw, D.S., Perlmutter, A.D., Jockin, H., and Shwachman, H. (1971). Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol* 106, 568-574.

Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med* 16, 396-399.

Hsieh, K.P., and Martin, T.F. (1992). Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol Endocrinol* 6, 1673-1681.

Hu, W., Howard, M., and Lukacs, G.L. (2001). Multiple endocytic signals in the C-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem J* 354, 561-572.

Huber, R., Berendes, R., Burger, A., Luecke, H., and Karshikov, A. (1992a). Annexin V-crystal structure and its implications on function. *Behring Inst Mitt*, 107-125.

Huber, R., Berendes, R., Burger, A., Schneider, M., Karshikov, A., Luecke, H., Romisch, J., and Paques, E. (1992b). Crystal and molecular structure of human annexin V after refinement. Implications for structure, membrane binding and ion channel formation of the annexin family of proteins. *J Mol Biol* 223, 683-704.

Huber, R., Romisch, J., and Paques, E.P. (1990). The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J* 9, 3867-3874.

Hudson, V.M. (2001). Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Radic Biol Med* 30, 1440-1461.

Hung, A.Y., and Sheng, M. (2002). PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277, 5699-5702.

Hunter, M.J., Treharne, K.J., Winter, A.K., Cassidy, D.M., Land, S., and Mehta, A. (2010). Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PLoS One* 5, e11598.

Hwang, T.C., and Kirk, K.L. (2013). The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a009498.

Hwang, T.C., Nagel, G., Nairn, A.C., and Gadsby, D.C. (1994). Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator C1 channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4698-4702.

Hwang, T.C., and Sheppard, D.N. (2009). Gating of the CFTR Cl⁻ channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J Physiol* 587, 2151-2161.

Hwang, T.C., Wang, F., Yang, I.C., and Reenstra, W.W. (1997). Genistein potentiates wild-type and delta F508-CFTR channel activity. *Am J Physiol* 273, C988-998.

Hwang, T.H., Schwiebert, E.M., and Guggino, W.B. (1996). Apical and basolateral ATP stimulates tracheal epithelial chloride secretion via multiple purinergic receptors. *Am J Physiol* 270, C1611-1623.

I

Illek, B., Fischer, H., Santos, G.F., Widdicombe, J.H., Machen, T.E., and Reenstra, W.W. (1995). cAMP-independent activation of CFTR Cl channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *Am J Physiol* 268, C886-893.

Imai, A., Ohno, T., Iida, K., Fuseya, T., Furui, T., and Tamaya, T. (1994). Presence of gonadotropin-releasing hormone receptor and its messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma and endometrium. *Gynecol Oncol* 55, 144-148.

Imai, A., Takagi, H., Horibe, S., Fuseya, T., and Tamaya, T. (1996). Coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to Gi protein in human reproductive tract tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3249-3253.

Isas, J.M., Cartailleur, J.P., Sokolov, Y., Patel, D.R., Langen, R., Luecke, H., Hall, J.E., and Haigler, H.T. (2000). Annexins V and XII insert into bilayers at mildly acidic pH and form ion channels. *Biochemistry* 39, 3015-3022.

Ishiguro, H., Steward, M., and Naruse, S. (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and SLC26 transporters in HCO₃⁻ secretion by pancreatic duct cells. *Sheng Li Xue Bao* 59, 465-476.

Itani, O.A., Chen, J.H., Karp, P.H., Ernst, S., Keshavjee, S., Parekh, K., Klesney-Tait, J., Zabner, J., and Welsh, M.J. (2011). Human cystic fibrosis airway epithelia have reduced Cl⁻ conductance but not increased Na⁺ conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10260-10265.

Iwashita, M., Evans, M.I., and Catt, K.J. (1986). Characterization of a gonadotropin-releasing hormone receptor site in term placenta and chorionic villi. *J Clin Endocrinol Metab* 62, 127-133.

J

Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D.B., Goldberg, A.L., and Riordan, J.R. (1995). Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83, 129-135.

Ji, H.L., Chalfant, M.L., Jovov, B., Lockhart, J.P., Parker, S.B., Fuller, C.M., Stanton, B.A., and Benos, D.J. (2000). The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 275, 27947-27956.

Jia, Y., Mathews, C.J., and Hanrahan, J.W. (1997). Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem* 272, 4978-4984.

Jiang, C., Fang, S.L., Xiao, Y.F., O'Connor, S.P., Nadler, S.G., Lee, D.W., Jefferson, D.M., Kaplan, J.M., Smith, A.E., and Cheng, S.H. (1998). Partial restoration of cAMP-stimulated CFTR chloride channel activity in DeltaF508 cells by deoxyspergualin. *Am J Physiol* 275, C171-178.

Jih, K.Y., and Hwang, T.C. (2013). Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4404-4409.

Jih, K.Y., Li, M., Hwang, T.C., and Bompadre, S.G. (2011). The most common cystic fibrosis-associated mutation destabilizes the dimeric state of the nucleotide-binding domains of CFTR. *J Physiol* 589, 2719-2731.

Johannesson, M., Gottlieb, C., and Hjelte, L. (1997). Delayed puberty in girls with cystic fibrosis despite good clinical status. *Pediatrics* 99, 29-34.

Johansen, P.G., Anderson, C.M., and Hadorn, B. (1968). Cystic fibrosis of the pancreas. A generalised disturbance of water and electrolyte movement in exocrine tissues. *Lancet* 1, 455-460.

Johnstone, S.A., Hubaishy, I., and Waisman, D.M. (1992). Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *J Biol Chem* 267, 25976-25981.

Jost, M., Thiel, C., Weber, K., and Gerke, V. (1992). Mapping of three unique Ca(2+)-binding sites in human annexin II. *Eur J Biochem* 207, 923-930.

Jost, M., Weber, K., and Gerke, V. (1994). Annexin II contains two types of Ca(2+)-binding sites. *Biochem J* 298 Pt 3, 553-559.

Jost, M., Zeuschner, D., Seemann, J., Weber, K., and Gerke, V. (1997). Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca²⁺ is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J Cell Sci* 110 (Pt 2), 221-228.

Jovov, B., Ismailov, I., Berdiev, B.K., Fuller, C.M., Sorscher, E.J., Dedman, J.R., Kaetzel, M.A., and Benos, D.J. (1995). Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J Biol Chem* 270, 29194-29200.

Jungwirth, A., Schally, A.V., Halmos, G., Groot, K., Szepeshazi, K., Pinski, J., and Armatis, P. (1998). Inhibition of the growth of Caki-I human renal adenocarcinoma in vivo by luteinizing hormone-releasing hormone antagonist Cetorelix, somatostatin analog RC-160, and bombesin antagonist RC-3940-II. *Cancer* 82, 909-917.

Jurkuvenaite, A., Chen, L., Bartoszewski, R., Goldstein, R., Bebek, Z., Matalon, S., and Collawn, J.F. (2010). Functional stability of rescued delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42, 363-372.

K

Kaetzel, M.A., Chan, H.C., Dubinsky, W.P., Dedman, J.R., and Nelson, D.J. (1994). A role for annexin IV in epithelial cell function. Inhibition of calcium-activated chloride conductance. *J Biol Chem* 269, 5297-5302.

Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L.G., Vaillant, C., and Lareyre, J.J. (2007). GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 153, 346-364.

Kaiser, U.B., Dushkin, H., Altherr, M.R., Beier, D.R., and Chin, W.W. (1994). Chromosomal localization of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene to human chromosome 4q13.1-q21.1 and mouse chromosome 5. *Genomics* 20, 506-508.

Kaiser, U.B., Jakubowiak, A., Steinberger, A., and Chin, W.W. (1993). Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinology* 133, 931-934.

- Kakar, S.S., and Jennes, L.** (1995). Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor mRNAs in various non-reproductive human tissues. *Cancer Lett* 98, 57-62.
- Kakar, S.S., Grizzle, W.E., and Neill, J.D.** (1994). The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 106, 145-149.
- Kakar, S.S., Malik, M.T., Winters, S.J., and Mazhawidza, W.** (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure, expression, and signaling transduction. *Vitam Horm* 69, 151-207.
- Kakar, S.S., Musgrove, L.C., Devor, D.C., Sellers, J.C., and Neill, J.D.** (1992). Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 289-295.
- Kakar, S.S., Winters, S.J., Zacharias, W., Miller, D.M., and Flynn, S.** (2003). Identification of distinct gene expression profiles associated with treatment of LbetaT2 cells with gonadotropin-releasing hormone agonist using microarray analysis. *Gene* 308, 67-77.
- Kalin, N., Claass, A., Sommer, M., Puchelle, E., and Tummler, B.** (1999). DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 103, 1379-1389.
- Kaneko, N., Matsuda, R., Hosoda, S., Kajita, T., and Ohta, Y.** (1996). Measurement of plasma annexin V by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 251, 65-80.
- Kaneko, N., Ago, H., Matsuda, R., Inagaki, E., and Miyano, M.** (1997a). Crystal structure of annexin V with its ligand K-201 as a calcium channel activity inhibitor. *J Mol Biol.* 1997 274(1), 16-20.
- Kaneko, N., Matsuda, R., Toda, M., and Shimamoto, K.** (1997b). Inhibition of annexin V-dependent Ca²⁺ movement in large unilamellar vesicles by K201, a new 1,4-benzothiazepine derivative. *Biochim Biophys Acta* 1330, 1-7.
- Kanelis, V., Hudson, R.P., Thibodeau, P.H., Thomas, P.J., and Forman-Kay, J.D.** (2009). NMR evidence for differential phosphorylation-dependent interactions in WT and DeltaF508 CFTR. *EMBO J* 29, 263-277.
- Kang, S.K., Choi, K.C., Cheng, K.W., Nathwani, P.S., Auersperg, N., and Leung, P.C.** (2000). Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. *Endocrinology* 141, 72-80.
- Kang, S.K., Choi, K.C., Tai, C.J., Auersperg, N., and Leung, P.C.** (2001a). Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor gene expression and antagonizes the growth inhibitory effects of GnRH in human ovarian surface epithelial and ovarian cancer cells. *Endocrinology* 142, 580-588.
- Kang, S.K., Tai, C.J., Nathwani, P.S., Choi, K.C., and Leung, P.C.** (2001b). Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142, 671-679.
- Kang, S.K., Tai, C.J., Nathwani, P.S., and Leung, P.C.** (2001c). Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142, 182-192.
- Karten, M.J., and Rivier, J.E.** (1986). Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev* 7, 44-66.
- Kartner, N., Augustinas, O., Jensen, T.J., Naismith, A.L., and Riordan, J.R.** (1992). Mislocalization of delta F508 CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nat Genet* 1, 321-327.
- Kawaminami, M., Etoh, S., Miyaoka, H., Sakai, M., Nishida, M., Kurusu, S., and Hashimoto, I.** (2002a). Annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in pituitary gonadotropes is induced by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and modulates GnRH stimulation of gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 75, 2-11.
- Kawaminami, M., Shibata, Y., Yaji, A., Kurusu, S., and Hashimoto, I.** (2003). Prolactin inhibits annexin 5 expression and apoptosis in the corpus luteum of pseudopregnant rats: involvement of local gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 144, 3625-3631.
- Kawaminami, M., Tsuchiyama, Y., Saito, S., Katayama, M., Kurusu, S., and Hashimoto, I.** (2002b). Gonadotropin-releasing hormone stimulates annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in the anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 915-920.
- Kawaminami, M., Uematsu, N., Funahashi, K., Kokubun, R., and Kurusu, S.** (2008). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) enhances annexin A5 mRNA expression through mitogen activated protein kinase (MAPK) in LbetaT2 pituitary gonadotrope cells. *Endocr J* 55, 1005-1014.
- Kawaminami, M., Yamaguchi, K., Miyagawa, S., Numazawa, S., Ioka, H., Kurusu, S., and Hashimoto, I.** (1998). Ovariectomy enhances the expression and nuclear translocation of annexin 5 in rat anterior pituitary gonadotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 141, 73-78.
- Keller, G., Schally, A.V., Gaiser, T., Nagy, A., Baker, B., Halmos, G., and Engel, J.B.** (2005a). Receptors for luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) expressed in human non-Hodgkin's lymphomas can be targeted for therapy with the cytotoxic LHRH analogue AN-207. *Eur J Cancer* 41, 2196-2202.

- Keller, G., Schally, A.V., Gaiser, T., Nagy, A., Baker, B., Halmos, G., and Engel, J.B.** (2005b). Receptors for luteinizing hormone releasing hormone expressed on human renal cell carcinomas can be used for targeted chemotherapy with cytotoxic luteinizing hormone releasing hormone analogues. *Clin Cancer Res* 11, 5549-5557.
- Kenis, H., van Genderen, H., Bennaghmouch, A., Rinia, H.A., Frederik, P., Narula, J., Hofstra, L., and Reutelingsperger, C.P.** (2004). Cell surface-expressed phosphatidylserine and annexin A5 open a novel portal of cell entry. *J Biol Chem* 279, 52623-52629.
- Kenis, H., van Genderen, H., Deckers, N.M., Lux, P.A., Hofstra, L., Narula, J., and Reutelingsperger, C.P.** (2006). Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp Cell Res* 312, 719-726.
- Kerbiriou, M., Le Drevo, M.A., Ferec, C., and Trouve, P.** (2007). Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6. *Biochim Biophys Acta* 1772, 1236-1249.
- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M., and Tsui, L.C.** (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245, 1073-1080.
- Kheifets, V., Bright, R., Inagaki, K., Schechtman, D., and Mochly-Rosen, D.** (2006). Protein kinase C delta (deltaPKC)-annexin V interaction: a required step in deltaPKC translocation and function. *J Biol Chem* 281, 23218-23226.
- Kim Chiaw, P., Wellhauser, L., Huan, L.J., Ramjeesingh, M., and Bear, C.E.** (2010). A chemical corrector modifies the channel function of F508del-CFTR. *Mol Pharmacol* 78, 411-418.
- Kim, H.J., and Kirsch, T.** (2008). Collagen/annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization. *J Biol Chem* 283, 10310-10317.
- Kim, J., and Hajjar, K.A.** (2002). Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front Biosci* 7, d341-348.
- Kim, J.Y., Han, W., Namkung, W., Lee, J.H., Kim, K.H., Shin, H., Kim, E., and Lee, M.G.** (2004). Inhibitory regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion-transporting activities by Shank2. *J Biol Chem* 279, 10389-10396.
- Kim, S.J., and Skach, W.R.** (2012). Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Front Pharmacol* 3, 201.
- Kim, S.W., Rhee, H.J., Ko, J., Kim, Y.J., Kim, H.G., Yang, J.M., Choi, E.C., and Na, D.S.** (2001). Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem* 276, 15712-15719.
- King, J.D., Jr., Fitch, A.C., Lee, J.K., McCane, J.E., Mak, D.O., Foskett, J.K., and Hallows, K.R.** (2009). AMP-activated protein kinase phosphorylation of the R domain inhibits PKA stimulation of CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 297, C94-101.
- King, J.D., Jr., Lee, J., Riemen, C.E., Neumann, D., Xiong, S., Foskett, J.K., Mehta, A., Muimo, R., and Hallows, K.R.** (2012). Role of binding and nucleoside diphosphate kinase A in the regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 287, 33389-33400.
- Kinseth, M.A., Anjard, C., Fuller, D., Guzzunti, G., Loomis, W.F., and Malhotra, V.** (2007). The Golgi-associated protein GRASP is required for unconventional protein secretion during development. *Cell* 130, 524-534.
- Kirchhausen, T.** (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 187-198.
- Kirk, K.L., and Wang, W. A.** (2011). A unified view of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gating: combining the allostereism of a ligand-gated channel with the enzymatic activity of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem* 286, 12813-12819.
- Kirsch, T.** (2005). Annexins - their role in cartilage mineralization. *Front Biosci* 10, 576-581.
- Kirsch, T., Harrison, G., Golub, E.E., and Nah, H.D.** (2000a). The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem* 275, 35577-35583.
- Kirsch, T., Nah, H.D., Demuth, D.R., Harrison, G., Golub, E.E., Adams, S.L., and Pacifici, M.** (1997a). Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization. *Biochemistry* 36, 3359-3367.
- Kirsch, T., Nah, H.D., Shapiro, I.M., and Pacifici, M.** (1997b). Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* 137, 1149-1160.
- Kirsch, T., and Pfaffle, M.** (1992). Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X collagen and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen). Implications for anchoring function between matrix vesicles and matrix proteins. *FEBS Lett* 310, 143-147.
- Kirsch, T., Swoboda, B., and Nah, H.** (2000b). Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 294-302.
- Kirsch, T., and von der Mark, K.** (1992). Remodelling of collagen types I, II and X and calcification of human fetal cartilage. *Bone Miner* 18, 107-117.
- Kirsch, T., and Wuthier, R.E.** (1994). Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. *J Biol Chem* 269, 11462-11469.

- Kirschnek, S., Adams, C., and Gulbins, E.** (2005). Annexin II is a novel receptor for *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 900-906.
- Kitamura, M.** (2011). Control of NF-kappaB and inflammation by the unfolded protein response. *Int Rev Immunol* 30, 4-15.
- Klement, K., Melle, C., Murzik, U., Diekmann, S., Norgauer, J., and Hemmerich, P.** (2012). Accumulation of annexin A5 at the nuclear envelope is a biomarker of cellular aging. *Mech Ageing Dev* 133, 508-522.
- Knowles, M., Gatzky, J., and Boucher, R.** (1981). Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 305, 1489-1495.
- Knowles, M., Gatzky, J., and Boucher, R.** (1983a). Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest* 71, 1410-1417.
- Knowles, M.R., and Boucher, R.C.** (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109, 571-577.
- Knowles, M.R., Stutts, M.J., Spock, A., Fischer, N., Gatzky, J.T., and Boucher, R.C.** (1983b). Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 221, 1067-1070.
- Knowlton, R.G., Cohen-Hagueneau, O., Van Cong, N., Frezal, J., Brown, V.A., Barker, D., Braman, J.C., Schumm, J.W., Tsui, L.C., Buchwald, M., et al.** (1985). A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318, 380-382.
- Ko, S.B., Shcheynikov, N., Choi, J.Y., Luo, X., Ishibashi, K., Thomas, P.J., Kim, J.Y., Kim, K.H., Lee, M.G., Naruse, S., et al.** (2002). A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *EMBO J* 21, 5662-5672.
- Ko, S.B., Zeng, W., Dorwart, M.R., Luo, X., Kim, K.H., Millen, L., Goto, H., Naruse, S., Soyombo, A., Thomas, P.J., et al.** (2004). Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat Cell Biol* 6, 343-350.
- Kogan, I., Ramjeesingh, M., Li, C., Kidd, J.F., Wang, Y., Leslie, E.M., Cole, S.P., and Bear, C.E.** (2003). CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J* 22, 1981-1989.
- Kohler, G., Hering, U., Zschornig, O., and Arnold, K.** (1997). Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH. *Biochemistry* 36, 8189-8194.
- Kongsuphol, P., Cassidy, D., Hieke, B., Treharne, K.J., Schreiber, R., Mehta, A., and Kunzelmann, K.** (2009). Mechanistic insight into control of CFTR by AMPK. *J Biol Chem* 284, 5645-5653.
- Konig, J., Schreiber, R., Voelcker, T., Mall, M., and Kunzelmann, K.** (2001). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibits ENaC through an increase in the intracellular Cl⁻ concentration. *EMBO Rep* 2, 1047-1051.
- Kopelman, H., Corey, M., Gaskin, K., Durie, P., Weizman, Z., and Forstner, G.** (1988). Impaired chloride secretion, as well as bicarbonate secretion, underlies the fluid secretory defect in the cystic fibrosis pancreas. *Gastroenterology* 95, 349-355.
- Kopito, L.E., Kosasky, H.J., and Shwachman, H.** (1973). Water and electrolytes in cervical mucus from patients with cystic fibrosis. *Fertil Steril* 24, 512-516.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., and van Oers, M.H.** (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420.
- Kotsias, B.A., and Peracchia, C.** (2005). Functional interaction between CFTR and Cx45 gap junction channels expressed in oocytes. *J Membr Biol* 203, 143-150.
- Kottler, M.L., and Richard, N.** (2008). La GnRH. *médecine thérapeutique, Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* vol. 10, n°2, 105-113.
- Kottler, M.L., Lorenzo, F., Bergametti, F., Commercon, P., Souchier, C., and Counis, R.** (1995). Subregional mapping of the human gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R) gene to 4q between the markers D4S392 and D4S409. *Hum Genet* 96, 477-480.
- Koulov, A.V., LaPointe, P., Lu, B., Razvi, A., Coppinger, J., Dong, M.Q., Matteson, J., Laister, R., Arrowsmith, C., Yates, J.R., 3rd, et al.** (2010). Biological and structural basis for Aha1 regulation of Hsp90 ATPase activity in maintaining proteostasis in the human disease cystic fibrosis. *Mol Biol Cell* 21, 871-884.
- Koushik, K., Bandi, N., Sundaram, S., and Kompella, U.B.** (2004). Evidence for LHRH-receptor expression in human airway epithelial (Calu-3) cells and its role in the transport of an LHRH agonist. *Pharm Res* 21, 1034-1046.
- Koushik, K.N., and Kompella, U.B.** (2004). Transport of deslorelin, an LHRH agonist, is vectorial and exhibits regional variation in excised bovine nasal tissue. *J Pharm Pharmacol* 56, 861-868.
- Koushik, K., Sunkara, G., Gwilt, P., and Kompella, U.B.** (2003). Pathways and kinetics of deslorelin degradation in an airway epithelial cell line (Calu-1). *Pharm Res* 20, 779-787.
- Krahling, S., Callahan, M.K., Williamson, P., and Schlegel, R.A.** (1999). Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ* 6, 183-189.

Krebs, L.J., Wang, X., Nagy, A., Schally, A.V., Prasad, P.N., and Liebow, C. (2002). A conjugate of doxorubicin and an analog of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone shows increased efficacy against oral and laryngeal cancers. *Oral Oncol* 38, 657-663.

Kreda, S.M., Mall, M., Mengos, A., Rochelle, L., Yankaskas, J., Riordan, J.R., and Boucher, R.C. (2005). Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Mol Biol Cell* 16, 2154-2167.

Krikun, G., Lockwood, C.J., Wu, X.X., Zhou, X.D., Guller, S., Calandri, C., Guha, A., Nemerson, Y., and Rand, J.H. (1994). The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and in vitro regulation. *Placenta* 15, 601-612.

Kristidis, P., Bozon, D., Corey, M., Markiewicz, D., Rommens, J., Tsui, L.C., and Durie, P. (1992). Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 50, 1178-1184.

Krouse, M.E., Talbott, J.F., Lee, M.M., Joo, N.S., and Wine, J.J. (2004). Acid and base secretion in the Calu-3 model of human serous cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L1274-L1283.

Kunzelmann, K. (2001). CFTR: interacting with everything? *News Physiol Sci* 16, 167-170.

Kunzelmann, K., Kiser, G.L., Schreiber, R., and Riordan, J.R. (1997). Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* 400, 341-344.

Kunzelmann, K., and Schreiber, R. (2012). Airway epithelial cells--hyperabsorption in CF? *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1232-1235.

Kunzelmann, K., Schreiber, R., and Cook, D. (2002). Mechanisms for the inhibition of amiloride-sensitive Na⁺ absorption by extracellular nucleotides in mouse trachea. *Pflugers Arch* 444, 220-226.

Kunzelmann, K., Tian, Y., Martins, J.R., Faria, D., Kongsuphol, P., Ousingsawat, J., Wolf, L., and Schreiber, R. (2012). Airway epithelial cells--functional links between CFTR and anoctamin dependent Cl⁻ secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1897-1900.

Kwon, S.H., Pollard, H., and Guggino, W.B. (2007). Knockdown of NHERF1 enhances degradation of temperature rescued DeltaF508 CFTR from the cell surface of human airway cells. *Cell Physiol Biochem* 20, 763-772.

L

Lahlou, N., Carel, J.C., Chaussain, J.L., and Roger, M. (2000). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GnRH agonists: clinical implications in pediatrics. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 1, 723-737.

Lambert, O., Gerke, V., Bader, M.F., Porte, F., and Brisson, A. (1997). Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 272, 42-55.

Lariviere, S., Garrel, G., Simon, V., Soh, J.W., Laverriere, J.N., Counis, R., and Cohen-Tannoudji, J. (2007). Gonadotropin-releasing hormone couples to 3',5'-cyclic adenosine-5'-monophosphate pathway through novel protein kinase Cdelta and -epsilon in LbetaT2 gonadotrope cells. *Endocrinology* 148, 1099-1107.

Latouche, J., Crumeyrolle-Arias, M., Jordan, D., Kopp, N., Augendre-Ferrante, B., Cedard, L., and Haour, F. (1989). GnRH receptors in human granulosa cells: anatomical localization and characterization by autoradiographic study. *Endocrinology* 125, 1739-1741.

Lauweryns, J.M., and Van Ranst, L. (1988). Protein gene product 9.5 expression in the lungs of humans and other mammals. Immunocytochemical detection in neuroepithelial bodies, neuroendocrine cells and nerves. *Neurosci Lett* 85, 311-316

Le Drevo, M.A., Benz, N., Kerbiriou, M., Giroux-Metges, M.A., Pennec, J.P., Trouve, P., and Ferec, C. (2008). Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator. *Biochim Biophys Acta* 1782, 605-614.

Le Heron, L., Guillaume, C., Velard, F., Braux, J., Touqui, L., Moriceau, S., Sermet-Gaudelus, I., Laurent-Maquin, D., and Jacquot, J. (2010). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E2 in human bone. *J Cyst Fibros* 9, 69-72.

Lecat, S., Verkade, P., Thiele, C., Fiedler, K., Simons, K., and Lafont, F. (2000). Different properties of two isoforms of annexin XIII in MDCK cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 14), 2607-2618.

Lee, C.Y., Ho, J., Chow, S.N., Yasojima, K., Schwab, C., and McGeer, P.L. (2000). Immunoidentification of gonadotropin releasing hormone receptor in human sperm, pituitary and cancer cells. *Am J Reprod Immunol* 44, 170-177.

Lee, J.H., Richter, W., Namkung, W., Kim, K.H., Kim, E., Conti, M., and Lee, M.G. (2007). Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors. *J Biol Chem* 282, 10414-10422.

Lee, M.G., Ahn, W., Lee, J.A., Kim, J.Y., Choi, J.Y., Moe, O.W., Milgram, S.L., Muallem, S., and Kim, K.H. (2001). Coordination of pancreatic HCO₃⁻ secretion by protein-protein interaction between membrane transporters. *JOP* 2, 203-206.

- Lee, W.S., and Hebert, S.C.** (1995). ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. I. Expression in rat distal nephron segments. *Am J Physiol* 268, F1124-1131.
- LeGrys, V.A.** (1996). Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J Pediatr* 129, 892-897.
- LeSimple, P., Liao, J., Robert, R., Gruenert, D.C., and Hanrahan, J.W.** (2010). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. *J Physiol* 588, 1195-1209.
- Leung, P.C., Cheng, C.K., and Zhu, X.M.** (2003). Multi-factorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol* 202, 145-153.
- Levine, J.E., and Duffy, M.T.** (1988). Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats. *Endocrinology* 122, 2211-2221.
- Lewis, H.A., Buchanan, S.G., Burley, S.K., Connors, K., Dickey, M., Dorwart, M., Fowler, R., Gao, X., Guggino, W.B., Hendrickson, W.A., et al.** (2004). Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* 23, 282-293.
- Lewis, H.A., Wang, C., Zhao, X., Hamuro, Y., Connors, K., Kearins, M.C., Lu, F., Sauder, J.M., Molnar, K.S., Coales, S.J., et al.** (2010). Structure and dynamics of NBD1 from CFTR characterized using crystallography and hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Mol Biol* 396, 406-430.
- Lewis, H.A., Zhao, X., Wang, C., Sauder, J.M., Rooney, I., Noland, B.W., Lorimer, D., Kearins, M.C., Connors, K., Condon, B., et al.** (2005). Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J Biol Chem* 280, 1346-1353.
- Li, C., Dandridge, K.S., Di, A., Marrs, K.L., Harris, E.L., Roy, K., Jackson, J.S., Makarova, N.V., Fujiwara, Y., Farrar, P.L., et al.** (2005). Lysophosphatidic acid inhibits cholera toxin-induced secretory diarrhea through CFTR-dependent protein interactions. *J Exp Med* 202, 975-986.
- Li, C., and Naren, A.P.** (2010). CFTR chloride channel in the apical compartments: spatiotemporal coupling to its interacting partners. *Integr Biol (Camb)* 2, 161-177.
- Li, C., Ramjeesingh, M., Wang, W., Garami, E., Hewryk, M., Lee, D., Rommens, J.M., Galley, K., and Bear, C.E.** (1996). ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 271, 28463-28468.
- Li, C., Roy, K., Dandridge, K., and Naren, A.P.** (2004). Molecular assembly of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in plasma membrane. *J Biol Chem* 279, 24673-24684.
- Liedtke, C.M., and Cole, T.S.** (1998). Antisense oligonucleotide to PKC-epsilon alters cAMP-dependent stimulation of CFTR in Calu-3 cells. *Am J Physiol* 275, C1357-1364.
- Liedtke, C.M., Raghuram, V., Yun, C.C., and Wang, X.** (2004). Role of a PDZ1 domain of NHERF1 in the binding of airway epithelial RACK1 to NHERF1. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1037-1044.
- Liemann, S., and Lewit-Bentley, A.** (1995). Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure* 3, 233-237.
- Limonta, P., Montagnani Marelli, M., Mai, S., Motta, M., Martini, L., and Moretti, R.M.** (2012). GnRH Receptors in Cancer: From Cell Biology to Novel Targeted Therapeutic Strategies. *Endocr Rev* 33, 784-811.
- Limonta, P., Moretti, R.M., Marelli, M.M., Dondi, D., Parenti, M., and Motta, M.** (1999). The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology* 140, 5250-5256.
- Lin, L.S., Roberts, V.J., and Yen, S.S.** (1995). Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 580-585.
- Ling, B.N., Zuckerman, J.B., Lin, C., Harte, B.J., McNulty, K.A., Smith, P.R., Gomez, L.M., Worrell, R.T., Eaton, D.C., and Kleyman, T.R.** (1997). Expression of the cystic fibrosis phenotype in a renal amphibian epithelial cell line. *J Biol Chem* 272, 594-600.
- Linnoila, R.I.** (2006). Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Lab Invest* 86, 425-444.
- Linsdell, P.** (2006). Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp Physiol* 91, 123-129.
- Linsdell, P., Evagelidis, A., and Hanrahan, J.W.** (2000). Molecular determinants of anion selectivity in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *Biophys J* 78, 2973-2982.
- Linsdell, P., and Hanrahan, J.W.** (1998). Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 275, C323-326.
- Linsdell, P., Tabcharani, J.A., Rommens, J.M., Hou, Y.X., Chang, X.B., Tsui, L.C., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W.** (1997). Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J Gen Physiol* 110, 355-364.
- Linton, K.J.** (2007). Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* 22, 122-130.

Liu, F., Usui, I., Evans, L.G., Austin, D.A., Mellon, P.L., Olefsky, J.M., and Webster, N.J. (2002). Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. *J Biol Chem* 277, 32099-32108.

Liu, L. (1999). Calcium-dependent self-association of annexin II: a possible implication in exocytosis. *Cell Signal* 11, 317-324.

Liu, X., O'Donnell, N., Landstrom, A., Skach, W.R., and Dawson, D.C. (2012). Thermal Instability of DeltaF508 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Channel Function: Protection by Single Suppressor Mutations and Inhibiting Channel Activity. *Biochemistry* 51, 5113-5124.

Loo, M.A., Jensen, T.J., Cui, L., Hou, Y., Chang, X.B., and Riordan, J.R. (1998). Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J* 17, 6879-6887.

Loo, T.W., Bartlett, M.C., and Clarke, D.M. (2004). Thapsigargin or curcumin does not promote maturation of processing mutants of the ABC transporters, CFTR, and P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 580-585.

Loo, T.W., Bartlett, M.C., and Clarke, D.M. (2008). Correctors promote folding of the CFTR in the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 413, 29-36.

Loo, T.W., Bartlett, M.C., and Clarke, D.M. (2009). Correctors enhance maturation of DeltaF508 CFTR by promoting interactions between the two halves of the molecule. *Biochemistry* 48, 9882-9890.

Lozach, A., Garrel, G., Lerrant, Y., Berault, A., and Counis, R. (1998). GnRH-dependent up-regulation of nitric oxide synthase I level in pituitary gonadotrophs mediates cGMP elevation during rat proestrus. *Mol Cell Endocrinol* 143, 43-51.

Lu, M., Dong, K., Egan, M.E., Giebisch, G.H., Boulpaep, E.L., and Hebert, S.C. Mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator forms cAMP-PKA-regulated apical chloride channels in cortical collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6082-6087.

Lu, M., Leng, Q., Egan, M.E., Caplan, M.J., Boulpaep, E.L., Giebisch, G.H., and Hebert, S.C. (2006). CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J Clin Invest* 116, 797-807.

Lubamba, B., Lebacqz, J., Lebecque, P., Vanbever, R., Leonard, A., Wallemacq, P., and Leal, T. (2009). Airway delivery of low-dose miglustat normalizes nasal potential difference in F508del cystic fibrosis mice. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 1022-1028.

Lukacs, G.L., Chang, X.B., Bear, C., Kartner, N., Mohamed, A., Riordan, J.R., and Grinstein, S. (1993). The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J Biol Chem* 268, 21592-21598.

Lukacs, G.L., Chang, X.B., Kartner, N., Rotstein, O.D., Riordan, J.R., and Grinstein, S. (1992). The cystic fibrosis transmembrane regulator is present and functional in endosomes. Role as a determinant of endosomal pH. *J Biol Chem* 267, 14568-14572.

Lukacs, G.L., Mohamed, A., Kartner, N., Chang, X.B., Riordan, J.R., and Grinstein, S. (1994). Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J* 13, 6076-6086.

Lukacs, G.L., Segal, G., Kartner, N., Grinstein, S., and Zhang, F. (1997). Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem J* 328 (Pt 2), 353-361.

Lukacs, G.L., and Verkman, A.S. (2012). CFTR: folding, misfolding and correcting the DeltaF508 conformational defect. *Trends Mol Med* 18, 81-91.

Luo, J., Pato, M.D., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W. (1998). Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am J Physiol* 274, C1397-1410.

Luo, Y., McDonald, K., and Hanrahan, J.W. (2009). Trafficking of immature DeltaF508-CFTR to the plasma membrane and its detection by biotinylation. *Biochem J* 419, 211-219, 212 p following 219.

Luz, S., Kongsuphol, P., Mendes, A.I., Romeiras, F., Sousa, M., Schreiber, R., Matos, P., Jordan, P., Mehta, A., Amaral, M.D., et al. (2010). Contribution of casein kinase 2 and spleen tyrosine kinase to CFTR trafficking and protein kinase A-induced activity. *Mol Cell Biol* 31, 4392-4404.

M

Ma, H.P., Li, L., Zhou, Z.H., Eaton, D.C., and Warnock, D.G. (2002). ATP masks stretch activation of epithelial sodium channels in A6 distal nephron cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F501-505.

Maderna, P., Yona, S., Perretti, M., and Godson, C. (2005). Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac(2-26). *J Immunol* 174, 3727-3733.

Mailliard, W.S., Haigler, H.T., and Schlaepfer, D.D. (1996). Calcium-dependent binding of S100C to the N-terminal domain of annexin I. *J Biol Chem* 271, 719-725.

- Mall, M., Bleich, M., Greger, R., Schreiber, R., and Kunzelmann, K.** (1998). The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J Clin Invest* 102, 15-21.
- Mall, M., Bleich, M., Kuehr, J., Brandis, M., Greger, R., and Kunzelmann, K.** (1999). CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am J Physiol* 277, G709-716.
- Mall, M., Hipper, A., Greger, R., and Kunzelmann, K.** (1996). Wild type but not deltaF508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 381, 47-52.
- Mall, M., Kreda, S.M., Mengos, A., Jensen, T.J., Hirtz, S., Seydewitz, H.H., Yankaskas, J., Kunzelmann, K., Riordan, J.R., and Boucher, R.C.** (2004). The DeltaF508 mutation results in loss of CFTR function and mature protein in native human colon. *Gastroenterology* 126, 32-41.
- Marcet, B., and Boeynaems, J.M.** (2006). Relationships between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, extracellular nucleotides and cystic fibrosis. *Pharmacol Ther* 112, 719-732.
- Marcorelles, P., Montier, T., Gillet, D., Lagarde, N., and Ferec, C.** (2007). Evolution of CFTR protein distribution in lung tissue from normal and CF human fetuses. *Pediatr Pulmonol* 42, 1032-1040.
- Mari, C., Karabiyikoglu, M., Goris, M.L., Tait, J.F., Yenari, M.A., and Blankenberg, F.G.** (2004). Detection of focal hypoxic-ischemic injury and neuronal stress in a rodent model of unilateral MCA occlusion/reperfusion using radiolabeled annexin V. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31, 733-739.
- Marshall, J., Fang, S., Ostedgaard, L.S., O'Riordan, C.R., Ferrara, D., Amara, J.F., Hoppe, H.t., Scheule, R.K., Welsh, M.J., Smith, A.E., et al.** (1994). Stoichiometry of recombinant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cells and its functional reconstitution into cells in vitro. *J Biol Chem* 269, 2987-2995.
- Martin, S.J., Finucane, D.M., Amarante-Mendes, G.P., O'Brien, G.A., and Green, D.R.** (1996). Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasm requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 271, 28753-28756.
- Mathias, J.R., Ferguson, K.L., and Clench, M.H.** (1989). Debilitating "functional" bowel disease controlled by leuprolide acetate, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analog. *Dig Dis Sci* 34, 761-766.
- Matsuda, R., Kaneko, N., Kikuchi, M., Chiwaki, F., Toda, M., Ieiri, T., Horikawa, Y., Shimizu, M., and Shimamoto, K.** (2003). Clinical significance of measurement of plasma annexin V concentration of patients in the emergency room. *Resuscitation* 57, 171-177.
- Matsui, H., Grubb, B.R., Tarran, R., Randell, S.H., Gatzky, J.T., Davis, C.W., and Boucher, R.C.** (1998). Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95, 1005-1015.
- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M., Arimura, A., and Schally, A.V.** (1971). Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 43, 1334-1339.
- McArdle, C.A., Franklin, J., Green, L., and Hislop, J.N.** (2002a). The gonadotrophin-releasing hormone receptor: signalling, cycling and desensitisation. *Arch Physiol Biochem* 110, 113-122.
- McArdle, C.A., Franklin, J., Green, L., and Hislop, J.N.** (2002b). Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *J Endocrinol* 173, 1-11.
- McCarty, N.A., and Zhang, Z.R.** (2001). Identification of a region of strong discrimination in the pore of CFTR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L852-867.
- McCray, P.B., Jr., Wohlford-Lenane, C.L., and Snyder, J.M.** (1992). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in human fetal lung tissue by in situ hybridization. *J Clin Invest* 90, 619-625.
- McDonald, F.J., Snyder, P.M., McCray, P.B., Jr., and Welsh, M.J.** (1994). Cloning, expression, and tissue distribution of a human amiloride-sensitive Na⁺ channel. *Am J Physiol* 266, L728-734.
- McNicholas, C.M., Guggino, W.B., Schwiebert, E.M., Hebert, S.C., Giebisch, G., and Egan, M.E.** (1996). Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8083-8088.
- Meacham, G.C., Lu, Z., King, S., Sorscher, E., Tousson, A., and Cyr, D.M.** (1999). The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J* 18, 1492-1505.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., and Cyr, D.M.** (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* 3, 100-105.
- Meers, P.** (1990). Location of tryptophans in membrane-bound annexins. *Biochemistry* 29, 3325-3330.
- Meers, P., and Mealy, T.** (1993). Relationship between annexin V tryptophan exposure, calcium, and phospholipid binding. *Biochemistry* 32, 5411-5418.

- Megli, F.M., Selvaggi, M., Liemann, S., Quagliariello, E., and Huber, R.** (1998). The calcium-dependent binding of annexin V to phospholipid vesicles influences the bilayer inner fluidity gradient. *Biochemistry* 37, 10540-10546.
- Melin, P., Hosy, E., Vivaudou, M., and Becq, F.** (2007). CFTR inhibition by glibenclamide requires a positive charge in cytoplasmic loop three. *Biochim Biophys Acta* 1768, 2438-2446.
- Mendoza, J.L., Schmidt, A., Li, Q., Nuvaga, E., Barrett, T., Bridges, R.J., Feranchak, A.P., Brautigam, C.A., and Thomas, P.J.** (2012). Requirements for efficient correction of DeltaF508 CFTR revealed by analyses of evolved sequences. *Cell* 148, 164-174.
- Menke, M., Ross, M., Gerke, V., and Steinem, C.** (2004). The molecular arrangement of membrane-bound annexin A2-S100A10 tetramer as revealed by scanning force microscopy. *ChemBiochem* 5, 1003-1006.
- Mennie, M.E., Gilfillan, A., Compton, M., Curtis, L., Liston, W.A., Pullen, I., Whyte, D.A., and Brock, D.J.** (1992). Prenatal screening for cystic fibrosis. *Lancet* 340, 214-216.
- Mennitt, P.A., Wade, J.B., Ecelbarger, C.A., Palmer, L.G., and Frindt, G.** (1997). Localization of ROMK channels in the rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 8, 1823-1830.
- Mense, M., Vergani, P., White, D.M., Altberg, G., Nairn, A.C., and Gadsby, D.C.** (2006). In vivo phosphorylation of CFTR promotes formation of a nucleotide-binding domain heterodimer. *EMBO J* 25, 4728-4739.
- Michoud, M.C., Robert, R., Hassan, M., Moynihan, B., Haston, C., Govindaraju, V., Ferraro, P., Hanrahan, J.W., and Martin, J.G.** (2009). Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance channel in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 217-222.
- Mickle, J.E., Macek, M., Jr., Fulmer-Smentek, S.B., Egan, M.M., Schwiebert, E., Guggino, W., Moss, R., and Cutting, G.R.** (1998). A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene associated with elevated sweat chloride concentrations in the absence of cystic fibrosis. *Hum Mol Genet* 7, 729-735.
- Millar, R.** (2005). [Recent data on GnRH receptors]. *Ann Urol (Paris)* 39 Suppl 3, S32-36.
- Millar, R., Lowe, S., Conklin, D., Pawson, A., Maudsley, S., Troskie, B., Ott, T., Millar, M., Lincoln, G., Sellar, R., et al.** (2001). A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9636-9641.
- Millar, R.P., Lu, Z.L., Pawson, A.J., Flanagan, C.A., Morgan, K., and Maudsley, S.R.** (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 25, 235-275.
- Millar, R.P., and Pawson, A.J.** (2004). Outside-in and inside-out signaling: the new concept that selectivity of ligand binding at the gonadotropin-releasing hormone receptor is modulated by the intracellular environment. *Endocrinology* 145, 3590-3593.
- Millar, R.P., Pawson, A.J., Morgan, K., Rissman, E.F., and Lu, Z.L.** (2008). Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol* 29, 17-35.
- Millard, T.H., Sharp, S.J., and Machesky, L.M.** (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* 380, 1-17.
- Mills, A.D., Yoo, C., Butler, J.D., Yang, B., Verkman, A.S., and Kurth, M.J.** (2009). Design and synthesis of a hybrid potentiator-corrector agonist of the cystic fibrosis mutant protein DeltaF508-CFTR. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 87-91.
- Mills, G.B., and Moolenaar, W.H.** (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 582-591.
- Mio, K., Ogura, T., Mio, M., Shimizu, H., Hwang, T.C., Sato, C., and Sohma, Y.** (2008). Three-dimensional reconstruction of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel revealed an ellipsoidal structure with orifices beneath the putative transmembrane domain. *J Biol Chem* 283, 30300-30310.
- Mira, J.P., Dubois, T., Oudinet, J.P., Lukowski, S., Russo-Marie, F., and Geny, B.** (1997). Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin V in differentiated permeabilized HL-60 cells. Evidence of crucial importance of domain I type II Ca²⁺-binding site in the mechanism of inhibition. *J Biol Chem* 272, 10474-10482.
- Mitchell-Heggs, P., Mearns, M., and Batten, J.C.** (1976). Cystic fibrosis in adolescents and adults. *Q J Med* 45, 479-504.
- Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K., and Matsuo, H.** (1984). Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3874-3878.
- Molinski, S., Eckford, P.D., Pasyk, S., Ahmadi, S., Chin, S., and Bear, C.E.** (2012). Functional Rescue of F508del-CFTR Using Small Molecule Correctors. *Front Pharmacol* 3, 160.
- Mollenhauer, J., Bee, J.A., Lizarbe, M.A., and von der Mark, K.** (1984). Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol* 98, 1572-1579.
- Mollenhauer, J., Mok, M.T., King, K.B., Gupta, M., Chubinskaya, S., Koepp, H., and Cole, A.A.** (1999). Expression of anchorin CII (cartilage annexin V) in human young, normal adult, and osteoarthritic cartilage. *J Histochem Cytochem* 47, 209-220.

- Mollenhauer, J., and von der Mark, K.** (1983). Isolation and characterization of a collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes. *EMBO J* 2, 45-50.
- Monceau, V., Belikova, Y., Kratassiouk, G., Charue, D., Camors, E., Communal, C., Trouve, P., Russo-Marie, F., and Charlemagne, D.** (2004). Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 64, 496-506.
- Montagnani Marelli, M., Moretti, R.M., Mai, S., Muller, O., Van Groeninghen, J.C., and Limonta, P.** (2009). Novel insights into GnRH receptor activity: role in the control of human glioblastoma cell proliferation. *Oncol Rep* 21, 1277-1282.
- Monterisi, S., Favia, M., Guerra, L., Cardone, R.A., Marzulli, D., Reshkin, S.J., Casavola, V., and Zaccolo, M.** (2012). CFTR regulation in human airway epithelial cells requires integrity of the actin cytoskeleton and compartmentalized cAMP and PKA activity. *J Cell Sci* 125, 1106-1117.
- Montserrat, C., Merten, M., and Figarella, C.** (1996). Defective ATP-dependent mucin secretion by cystic fibrosis pancreatic epithelial cells. *FEBS Lett* 393, 264-268.
- Moore, P.B., Kraus-Friedmann, N., and Dedman, J.R.** (1984). Unique calcium-dependent hydrophobic binding proteins: possible independent mediators of intracellular calcium distinct from calmodulin. *J Cell Sci* 72, 121-133.
- Morales, M.M., Carroll, T.P., Morita, T., Schwiebert, E.M., Devuyt, O., Wilson, P.D., Lopes, A.G., Stanton, B.A., Dietz, H.C., Cutting, G.R., et al.** (1996). Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am J Physiol* 270, F1038-1048.
- Morales, P.** (1998). Gonadotropin-releasing hormone increases ability of the spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Biol Reprod* 59, 426-430.
- Morales, P., and Llanos, M.** (1996). Interaction of human spermatozoa with the zona pellucida of oocyte: development of the acrosome reaction. *Front Biosci* 1, d146-160.
- Moretti, R.M., Monagnani Marelli, M., Van Groeninghen, J.C., Motta, M., and Limonta, P.** (2003). Inhibitory activity of luteinizing hormone-releasing hormone on tumor growth and progression. *Endocr Relat Cancer* 10, 161-167.
- Moretti, R.M., Montagnani Marelli, M., Van Groeninghen, J.C., and Limonta, P.** (2002). Locally expressed LHRH receptors mediate the oncostatic and antimetastatic activity of LHRH agonists on melanoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3791-3797.
- Morito, D., Hirao, K., Oda, Y., Hosokawa, N., Tokunaga, F., Cyr, D.M., Tanaka, K., Iwai, K., and Nagata, K.** (2008). Gp78 cooperates with RMA1 in endoplasmic reticulum-associated degradation of CFTRDeltaF508. *Mol Biol Cell* 19, 1328-1336.
- Mornon, J.P., Lehn, P., and Callebaut, I.** (2008). Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cell Mol Life Sci* 65, 2594-2612.
- Mornon, J.P., Lehn, P., and Callebaut, I.** (2009). Molecular models of the open and closed states of the whole human CFTR protein. *Cell Mol Life Sci* 66, 3469-3486.
- Moskwa, P., Lorentzen, D., Excoffon, K.J., Zabner, J., McCray, P.B., Jr., Nauseef, W.M., Dupuy, C., and Banfi, B.** (2007). A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 174-183.
- Moss, S.E., and Morgan, R.O.** (2004). The annexins. *Genome Biol* 5, 219.
- Moyer, B.D., Denton, J., Karlson, K.H., Reynolds, D., Wang, S., Mickle, J.E., Milewski, M., Cutting, G.R., Guggino, W.B., Li, M., et al.** (1999). A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* 104, 1353-1361.
- Moyer, B.D., Duhaime, M., Shaw, C., Denton, J., Reynolds, D., Karlson, K.H., Pfeiffer, J., Wang, S., Mickle, J.E., Milewski, M., et al.** (2000). The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *J Biol Chem* 275, 27069-27074.
- Muallem, D., and Vergani, P.** (2009). Review. ATP hydrolysis-driven gating in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 247-255.
- Muimo, R.** (2009). Regulation of CFTR function by annexin A2-S100A10 complex in health and disease. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No Focus, F14-19.
- Muimo, R., Crawford, R.M., and Mehta, A.** (2006). Nucleoside diphosphate kinase A as a controller of AMP-kinase in airway epithelia. *J Bioenerg Biomembr* 38, 181-187.
- Mulberg, A.E., Resta, L.P., Wiedner, E.B., Altschuler, S.M., Jefferson, D.M., and Broussard, D.L.** (1995). Expression and localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA and its protein in rat brain. *J Clin Invest* 96, 646-652.
- Mulberg, A.E., Weyler, R.T., Altschuler, S.M., and Hyde, T.M.** (1998). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in human hypothalamus. *Neuroreport* 9, 141-144.
- Munck, A., and Roussey, M.** (2008). [The French nationwide cystic fibrosis newborn screening program: strategy and results]. *Arch Pediatr* 15 Suppl 1, S1-6.

N

- Naor, Z.** (2009). Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol* 30, 10-29.
- Naor, Z., and Huhtaniemi, I.** (2012). Interactions of the GnRH receptor with heterotrimeric G proteins. *Front Neuroendocrinol*.
- Naren, A.P., Cobb, B., Li, C., Roy, K., Nelson, D., Heda, G.D., Liao, J., Kirk, K.L., Sorscher, E.J., Hanrahan, J., et al.** (2003). A macromolecular complex of beta 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 342-346.
- Naren, A.P., Cormet-Boyaka, E., Fu, J., Villain, M., Blalock, J.E., Quick, M.W., and Kirk, K.L.** (1999). CFTR chloride channel regulation by an interdomain interaction. *Science* 286, 544-548.
- Naren, A.P., Nelson, D.J., Xie, W., Jovov, B., Pevsner, J., Bennett, M.K., Benos, D.J., Quick, M.W., and Kirk, K.L.** (1997). Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. *Nature* 390, 302-305.
- Naren, A.P., Quick, M.W., Collawn, J.F., Nelson, D.J., and Kirk, K.L.** (1998). Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10972-10977.
- Navarro, J., Grosskopf, C., Vidailhet, M., Briard, M.L., and Farriaux, J.P.** (2003). [National program for neonatal screening for cystic fibrosis: implementation and preliminary results]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 32, 1S56-60.
- Neill, J.D., Duck, L.W., Sellers, J.C., and Musgrove, L.C.** (2001). A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1012-1018.
- Neudauer, C.L., Joberty, G., and Macara, I.G.** (2001). PIST: a novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 541-547.
- Niel, F., Legendre, M., Bienvenu, T., Bieth, E., Lalau, G., Sermet, I., Bondeux, D., Boukari, R., Derelle, J., Levy, P., et al.** (2006). A new large CFTR rearrangement illustrates the importance of searching for complex alleles. *Hum Mutat* 27, 716-717.
- Nikolics, K., Mason, A.J., Szonyi, E., Ramachandran, J., and Seeburg, P.H.** (1985). A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 316, 511-517.
- Nilius, B., Gerke, V., Prenen, J., Szucs, G., Heinke, S., Weber, K., and Droogmans, G.** (1996). Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271, 30631-30636.
- Noel, S., Wilke, M., Bot, A.G., De Jonge, H.R., and Becq, F.** (2008). Parallel improvement of sodium and chloride transport defects by miglustat (n-butyldeoxynojirimycin) in cystic fibrosis epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 1016-1023.
- Norez, C., Antigny, F., Becq, F., and Vandebrouck, C.** (2006a). Maintaining low Ca²⁺ level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. *Traffic* 7, 562-573.
- Norez, C., Antigny, F., Noel, S., Vandebrouck, C., and Becq, F.** (2009). A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 217-225.
- Norez, C., Bilan, F., Kitzis, A., Mettey, Y., and Becq, F.** (2008a). Proteasome-dependent pharmacological rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator revealed by mutation of glycine 622. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 89-99.
- Norez, C., Noel, S., Wilke, M., Bijvelds, M., Jorna, H., Melin, P., DeJonge, H., and Becq, F.** (2006b). Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett* 580, 2081-2086.
- Norez, C., Pasetto, M., Dehecchi, M.C., Barison, E., Anselmi, C., Tamanini, A., Quiri, F., Cattel, L., Rizzotti, P., Dosio, F., et al.** (2008b). Chemical conjugation of DeltaF508-CFTR corrector deoxyspergualin to transporter human serum albumin enhances its ability to rescue Cl⁻ channel functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, L336-347.
- Norez, C., Vandebrouck, C., Antigny, F., Dannhoffer, L., Blondel, M., and Becq, F.** (2008c). Guanabenz, an alpha2-selective adrenergic agonist, activates Ca²⁺-dependent chloride currents in cystic fibrosis human airway epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 592, 33-40.

O

- Odolczyk, N., Fritsch, J., Norez, C., Serval, N., da Cunha, M.F., Bitam, S., Kupniewska, A., Wiszniewski, L., Colas, J., Tarnowski, K., et al.** (2013). Discovery of novel potent DeltaF508-CFTR correctors that target the nucleotide binding domain. *EMBO Mol Med* 5, 1484-1501.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Ito, D., and Kohsaka, S.** (1996). Molecular cloning and characterization of annexin V-binding proteins with highly hydrophilic peptide structure. *J Neurochem* 67, 89-97.
- Okiyoneda, T., Apaja, P.M., and Lukacs, G.L.** (2011). Protein quality control at the plasma membrane. *Curr Opin Cell Biol* 23, 483-491.

- Okiyoneda, T., Barriere, H., Bagdany, M., Rabeh, W.M., Du, K., Hohfeld, J., Young, J.C., and Lukacs, G.L.** (2010). Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science* 329, 805-810.
- Okiyoneda, T., Harada, K., Takeya, M., Yamahira, K., Wada, I., Shuto, T., Suico, M.A., Hashimoto, Y., and Kai, H.** (2004a). Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol Biol Cell* 15, 563-574.
- Okiyoneda, T., Harada, K., Yamahira, K., Wada, I., Hashimoto, Y., Ueno, K., Suico, M.A., Shuto, T., and Kai, H.** (2004b). Characterization of the trafficking pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in baby hamster kidney cells. *J Pharmacol Sci* 95, 471-475.
- Okiyoneda, T., and Lukacs, G.L.** (2007). Cell surface dynamics of CFTR: the ins and outs. *Biochim Biophys Acta* 1773, 476-479.
- Okiyoneda, T., Niibori, A., Harada, K., Kohno, T., Michalak, M., Duszyk, M., Wada, I., Ikawa, M., Shuto, T., Suico, M.A., et al.** (2008). Role of calnexin in the ER quality control and productive folding of CFTR; differential effect of calnexin knockout on wild-type and DeltaF508 CFTR. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1585-1594.
- Okuse, K., Malik-Hall, M., Baker, M.D., Poon, W.Y., Kong, H., Chao, M.V., and Wood, J.N.** (2002). Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature* 417, 653-656.
- Oling, F., Bergsma-Schutter, W., and Brisson, A.** (2001). Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *J Struct Biol* 133, 55-63.
- Oppenheimer, E.A., Case, A.L., Esterly, J.R., and Rothberg, R.M.** (1970). Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 108, 673-674.
- Ostedgaard, L.S., Baldursson, O., Vermeer, D.W., Welsh, M.J., and Robertson, A.D.** (2000). A functional R domain from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is predominantly unstructured in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5657-5662.
- Ostedgaard, L.S., Baldursson, O., and Welsh, M.J.** (2001). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by its R domain. *J Biol Chem* 276, 7689-7692.
- Ostedgaard, L.S., Randak, C., Rokhlina, T., Karp, P., Vermeer, D., Ashbourne Excoffon, K.J., and Welsh, M.J.** (2003). Effects of C-terminal deletions on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in cystic fibrosis airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1937-1942.
- Ousingsawat, J., Martins, J.R., Schreiber, R., Rock, J.R., Harfe, B.D., and Kunzelmann, K.** (2009). Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport. *J Biol Chem* 284, 28698-28703.

P

- Pastor-Soler, N., Bagnis, C., Sabolic, I., Tyszkowski, R., McKee, M., Van Hoek, A., Breton, S., and Brown, D.** (2001). Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biol Reprod* 65, 384-393.
- Pasyk, E.A., Morin, X.K., Zeman, P., Garami, E., Galley, K., Huan, L.J., Wang, Y., and Bear, C.E.** (1998). A conserved region of the R domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is important in processing and function. *J Biol Chem* 273, 31759-31764.
- Patel, D.M., Ahmad, S.F., Weiss, D.G., Gerke, V., and Kuznetsov, S.A.** (2011). Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. *J Cell Sci* 124, 578-588.
- Pati, D., and Habibi, H.R.** (1995). Inhibition of human hepatocarcinoma cell proliferation by mammalian and fish gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinology* 136, 75-84.
- Pearl, L.H., and Prodromou, C.** (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem* 75, 271-294.
- Pedemonte, N., Lukacs, G.L., Du, K., Caci, E., Zegarra-Moran, O., Galiotta, L.J., and Verkman, A.S.** (2005). Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* 115, 2564-2571.
- Pedemonte, N., Tomati, V., Sondo, E., Caci, E., Millo, E., Armirotti, A., Damonte, G., Zegarra-Moran, O., and Galiotta, L.J.** (2011). Dual activity of aminoarylthiazoles on the trafficking and gating defects of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel caused by cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem* 286, 15215-15226.
- Pedemonte, N., Tomati, V., Sondo, E., and Galiotta, L.J.** (2010). Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C866-874.
- Pellicer, A., and Miro, F.** (1990). Steroidogenesis in vitro of human granulosa-luteal cells pretreated in vivo with gonadotropin-releasing hormone analogs. *Fertil Steril* 54, 590-596.
- Peng, C., Fan, N.C., Ligier, M., Vaananen, J., and Leung, P.C.** (1994). Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 135, 1740-1746.

- Penque, D., Mendes, F., Beck, S., Farinha, C., Pacheco, P., Nogueira, P., Lavinha, J., Malho, R., and Amaral, M.D.** (2000). Cystic fibrosis F508del patients have apically localized CFTR in a reduced number of airway cells. *Lab Invest* 80, 857-868.
- Perez, A., Issler, A.C., Cotton, C.U., Kelley, T.J., Verkman, A.S., and Davis, P.B.** (2007). CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L383-395.
- Perretti, M., and Flower, R.J.** (1993). Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. *J Immunol* 150, 992-999.
- Perretti, M., and Gavins, F.N.** (2003). Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci* 18, 60-64.
- Peters, K.W., Qi, J., Watkins, S.C., and Frizzell, R.A.** (1999). Syntaxin 1A inhibits regulated CFTR trafficking in xenopus oocytes. *Am J Physiol* 277, C174-180.
- Picciano, J.A., Ameen, N., Grant, B.D., and Bradbury, N.A.** (2003). Rme-1 regulates the recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C1009-1018.
- Picciotto, M.R., Cohn, J.A., Bertuzzi, G., Greengard, P., and Nairn, A.C.** (1992). Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 267, 12742-12752.
- Pietrement, C., Da Silva, N., Silberstein, C., James, M., Marsolais, M., Van Hoek, A., Brown, D., Pastor-Soler, N., Ameen, N., Laprade, R., et al.** (2008). Role of NHERF1, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, and cAMP in the regulation of aquaporin 9. *J Biol Chem* 283, 2986-2996.
- Pigault, C., Follenius-Wund, A., and Chabbert, M.** (1999). Role of Trp-187 in the annexin V-membrane interaction: a molecular mechanics analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 484-489.
- Pigault, C., Follenius-Wund, A., Schmutz, M., Freyssinet, J.M., and Brisson, A.** (1994). Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J Mol Biol* 236, 199-208.
- Pignatti, P.F., Bombieri, C., Marigo, C., Benetazzo, M., and Luisetti, M.** (1995). Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Hum Mol Genet* 4, 635-639.
- Pind, S., Riordan, J.R., and Williams, D.B.** (1994). Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 269, 12784-12788.
- Polak, J.M., Becker, K.L., Cutz, E., Gail, D.B., Goniakowska-Witalinska, L., Gosney, J.R., Lauweryns, J.M., Linnoila, I., McDowell, E.M., Miller, Y.E., et al.** (1993). Lung endocrine cell markers, peptides, and amines. *Anat Rec* 236, 169-171.
- Pollard, H.B., Ji, X.D., Jozwik, C., and Jacobowitz, D.M.** (2005). High abundance protein profiling of cystic fibrosis lung epithelial cells. *Proteomics* 5, 2210-2226.
- Pollard, H.B., and Rojas, E.** (1988). Ca²⁺-activated synexin forms highly selective, voltage-gated Ca²⁺ channels in phosphatidylserine bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2974-2978.
- Pollard, H.B., Rojas, E., Pastor, R.W., Rojas, E.M., Guy, H.R., and Burns, A.L.** (1991). Synexin: molecular mechanism of calcium-dependent membrane fusion and voltage-dependent calcium-channel activity. Evidence in support of the "hydrophobic bridge hypothesis" for exocytotic membrane fusion. *Ann N Y Acad Sci* 635, 328-351.
- Powell, M.A., and Glenney, J.R.** (1987). Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem J* 247, 321-328.
- Prat, A.G., Cunningham, C.C., Jackson, G.R., Jr., Borkan, S.C., Wang, Y., Ausiello, D.A., and Cantiello, H.F.** (1999). Actin filament organization is required for proper cAMP-dependent activation of CFTR. *Am J Physiol* 277, C1160-1169.
- Prat, A.G., Xiao, Y.F., Ausiello, D.A., and Cantiello, H.F.** (1995). cAMP-independent regulation of CFTR by the actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 268, C1552-1561.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A.** (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884-888.
- Prince, L.S., Peter, K., Hatton, S.R., Zaliauskiene, L., Cotlin, L.F., Clancy, J.P., Marchase, R.B., and Collawn, J.F.** (1999). Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal. *J Biol Chem* 274, 3602-3609.
- Prince, L.S., Workman, R.B., Jr., and Marchase, R.B.** (1994). Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5192-5196.
- Protasevich, I., Yang, Z., Wang, C., Atwell, S., Zhao, X., Emtage, S., Wetmore, D., Hunt, J.F., and Brouillette, C.G.** (2010). Thermal unfolding studies show the disease causing F508del mutation in CFTR thermodynamically destabilizes nucleotide-binding domain 1. *Protein Sci* 19, 1917-1931.
- Puchelle, E., Gaillard, D., Ploton, D., Hinnrasky, J., Fuchey, C., Boutterin, M.C., Jacquot, J., Dreyer, D., Pavirani, A., and Dalemans, W.** (1992). Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 485-491.

Q

Quintanar, J.L., and Salinas, E. (2008). Neurotrophic effects of GnRH on neurite outgrowth and neurofilament protein expression in cultured cerebral cortical neurons of rat embryos. *Neurochem Res* 33, 1051-1056.

Quintanar, J.L., Salinas, E., and Gonzalez, R. (2009). Gonadotropin-releasing hormone receptor in spinal cord neurons of embryos and adult rats. *Neurosci Lett* 461, 21-24.

Quintanar, J.L., Salinas, E., and Quintanar-Stephano, A. (2010). Gonadotropin-releasing hormone reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Neuropeptides* 45, 43-48.

Quinton, P.M. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301, 421-422.

R

Rabeh, W.M., Bossard, F., Xu, H., Okiyoneda, T., Bagdany, M., Mulvihill, C.M., Du, K., di Bernardo, S., Liu, Y., Konermann, L., et al. (2012). Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore DeltaF508 CFTR folding and function. *Cell* 148, 150-163.

Radovick, S., Wondisford, F.E., Nakayama, Y., Yamada, M., Cutler, G.B., Jr., and Weintraub, B.D. (1990). Isolation and characterization of the human gonadotropin-releasing hormone gene in the hypothalamus and placenta. *Mol Endocrinol* 4, 476-480.

Rafferty, S., Alcolado, N., Norez, C., Chappe, F., Pelzer, S., Becq, F., and Chappe, V. (2009). Rescue of functional F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by vasoactive intestinal peptide in the human nasal epithelial cell line JME/CF15. *J Pharmacol Exp Ther* 331, 2-13.

Raga, F., Casan, E.M., Kruessel, J.S., Wen, Y., Huang, H.Y., Nezhat, C., and Polan, M.L. (1998). Quantitative gonadotropin-releasing hormone gene expression and immunohistochemical localization in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod* 59, 661-669.

Raga, F., Casan, E.M., Wen, Y., Huang, H.Y., Bonilla-Musoles, F., and Polan, M.L. (1999). Independent regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 in human endometrial stromal cells by gonadotropin-releasing hormone: implications in early human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 636-642.

Ramjeesingh, M., Li, C., Garami, E., Huan, L.J., Galley, K., Wang, Y., and Bear, C.E. (1999). Walker mutations reveal loose relationship between catalytic and channel-gating activities of purified CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). *Biochemistry* 38, 1463-1468.

Ramjeesingh, M., Li, C., Kogan, I., Wang, Y., Huan, L.J., and Bear, C.E. (2001). A monomer is the minimum functional unit required for channel and ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 40, 10700-10706.

Ramsey, B.W., Davies, J., McElvaney, N.G., Tullis, E., Bell, S.C., Drevinek, P., Griese, M., McKone, E.F., Wainwright, C.E., Konstan, M.W., et al. (2011). A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 365, 1663-1672.

Rand, J.H. (2000). The annexinopathies: a new category of diseases. *Biochim Biophys Acta* 1498, 169-173.

Rand, J.H., Arslan, A.A., Wu, X.X., Wein, R., Mulholland, J., Shah, M., van Heerde, W.L., Reutelingsperger, C.P., Lockwood, C.J., and Kuczynski, E. (2006). Reduction of circulating annexin A5 levels and resistance to annexin A5 anticoagulant activity in women with recurrent spontaneous pregnancy losses. *Am J Obstet Gynecol* 194, 182-188.

Rand, J.H., and Wu, X.X. (2004). Antibody-mediated interference with annexins in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res* 114, 383-389.

Rand, J.H., Wu, X.X., Quinn, A.S., Chen, P.P., McCrae, K.R., Bovill, E.G., and Taatjes, D.J. (2003). Human monoclonal antiphospholipid antibodies disrupt the annexin A5 anticoagulant crystal shield on phospholipid bilayers: evidence from atomic force microscopy and functional assay. *Am J Pathol* 163, 1193-1200.

Ratjen, F., Durham, T., Navratil, T., Schaberg, A., Accurso, F.J., Wainwright, C., Barnes, M., and Moss, R.B. (2012). Long term effects of denufisol tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 11, 539-549.

Ravassa, S., Bennaghmouch, A., Kenis, H., Lindhout, T., Hackeng, T., Narula, J., Hofstra, L., and Reutelingsperger, C. (2005). Annexin A5 down-regulates surface expression of tissue factor: a novel mechanism of regulating the membrane receptor repertoire. *J Biol Chem* 280, 6028-6035.

Raynal, P., Hullin, F., Ragab-Thomas, J.M., Fauvel, J., and Chap, H. (1993). Annexin 5 as a potential regulator of annexin 1 phosphorylation by protein kinase C. In vitro inhibition compared with quantitative data on annexin distribution in human endothelial cells. *Biochem J* 292 (Pt 3), 759-765.

Raynal, P., and Pollard, H.B. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197, 63-93.

- Reczek, D., and Bretscher, A.** (1998). The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule. *J Biol Chem* 273, 18452-18458.
- Reddy, M.M., Quinton, P.M., Haws, C., Wine, J.J., Grygorczyk, R., Tabcharani, J.A., Hanrahan, J.W., Gunderson, K.L., and Kopito, R.R.** (1996). Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science* 271, 1876-1879.
- Reisin, I.L., Prat, A.G., Abraham, E.H., Amara, J.F., Gregory, R.J., Ausiello, D.A., and Cantiello, H.F.** (1994). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem* 269, 20584-20591.
- Rennolds, J., Tower, C., Musgrove, L., Fan, L., Maloney, K., Clancy, J.P., Kirk, K.L., Sztul, E., and Cormet-Boyaka, E.** (2008). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking is mediated by the COPI coat in epithelial cells. *J Biol Chem* 283, 833-839.
- Rescher, U., and Gerke, V.** (2004). Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117, 2631-2639.
- Rescher, U., Zobiack, N., and Gerke, V.** (2000). Intact Ca(2+)-binding sites are required for targeting of annexin 1 to endosomal membranes in living HeLa cells. *J Cell Sci* 113 (Pt 22), 3931-3938.
- Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F., and Lewit-Bentley, A.** (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol* 6, 89-95.
- Reutelingsperger, C.P., Hornstra, G., and Hemker, H.C.** (1985). Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem* 151, 625-629.
- Reviakine, I.I., Bergsma-Schutter, W., and Brisson, A.** (1998). Growth of Protein 2-D Crystals on Supported Planar Lipid Bilayers Imaged in Situ by AFM. *J Struct Biol* 121, 356-361.
- Rich, D.P., Anderson, M.P., Gregory, R.J., Cheng, S.H., Paul, S., Jefferson, D.M., McCann, J.D., Klinger, K.W., Smith, A.E., and Welsh, M.J.** (1990). Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 347, 358-363.
- Rich, D.P., Berger, H.A., Cheng, S.H., Travis, S.M., Saxena, M., Smith, A.E., and Welsh, M.J.** (1993). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by negative charge in the R domain. *J Biol Chem* 268, 20259-20267.
- Richter, R.P., Him, J.L., Tessier, B., Tessier, C., and Brisson, A.R.** (2005). On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers. *Biophys J* 89, 3372-3385.
- Riordan, J.R.** (1993). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* 55, 609-630.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., et al.** (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.
- Robert, R., Thoreau, V., Norez, C., Cantereau, A., Kitzis, A., Mettey, Y., Rogier, C., and Becq, F.** (2004). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel by beta-adrenergic agonists and vasoactive intestinal peptide in rat smooth muscle cells and its role in vasorelaxation. *J Biol Chem* 279, 21160-21168.
- Rode, B., Dirami, T., Bakouh, N., Rizk-Rabin, M., Norez, C., Lhuillier, P., Lores, P., Jollivet, M., Melin, P., Zvetkova, I., et al.** (2012). The testis anion transporter TAT1 (SLC26A8) physically and functionally interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel: a potential role during sperm capacitation. *Hum Mol Genet* 21, 1287-1298.
- Rojas, E., Pollard, H.B., Haigler, H.T., Parra, C., and Burns, A.L.** (1990). Calcium-activated endonexin II forms calcium channels across acidic phospholipid bilayer membranes. *J Biol Chem* 265, 21207-21215.
- Romey, M.C.** (2006). [Functional characterization of naturally occurring CFTR mutants: interest for cystic fibrosis]. *Ann Biol Clin (Paris)* 64, 429-437.
- Rommens, J.M., Iannuzzi, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., et al.** (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245, 1059-1065.
- Rosenberg, M.F., Kamis, A.B., Aleksandrov, L.A., Ford, R.C., and Riordan, J.R.** (2004). Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* 279, 39051-39057.
- Rosengarth, A., Gerke, V., and Luecke, H.** (2001). X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. *J Mol Biol* 306, 489-498.
- Rosengarth, A., and Luecke, H.** (2003). A calcium-driven conformational switch of the N-terminal and core domains of annexin A1. *J Mol Biol* 326, 1317-1325.
- Rosser, M.F., Grove, D.E., Chen, L., and Cyr, D.M.** (2008). Assembly and misassembly of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: folding defects caused by deletion of F508 occur before and after the calnexin-dependent association of membrane spanning domain (MSD) 1 and MSD2. *Mol Biol Cell* 19, 4570-4579.

Rothhut, B. (1997). Participation of annexins in protein phosphorylation. *Cell Mol Life Sci* 53, 522-526.

Rothhut, B., Dubois, T., Feliers, D., Russo-Marie, F., and Oudinet, J.P. (1995). Inhibitory effect of annexin V on protein kinase C activity in mesangial cell lysates. *Eur J Biochem* 232, 865-872.

Rubenstein, R.C., Egan, M.E., and Zeitlin, P.L. (1997). In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest* 100, 2457-2465.

Rubenstein, R.C., Lockwood, S.R., Lide, E., Bauer, R., Suaud, L., and Grumbach, Y. (2010). Regulation of endogenous ENaC functional expression by CFTR and DeltaF508-CFTR in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L88-L101.

Rubenstein, R.C., and Lyons, B.M. (2001). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates HSC70 expression by facilitating mRNA degradation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L43-51.

Rubenstein, R.C., and Zeitlin, P.L. (1998). A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 484-490.

Rubenstein, R.C., and Zeitlin, P.L. (2000). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C259-267.

Ruknudin, A., Schulze, D.H., Sullivan, S.K., Lederer, W.J., and Welling, P.A. (1998). Novel subunit composition of a renal epithelial KATP channel. *J Biol Chem* 273, 14165-14171.

Ruf, F., Fink, M.Y., and Sealfon, S.C. (2003). Structure of the GnRH receptor-stimulated signaling network: insights from genomics. *Front Neuroendocrinol* 24, 181-199.

S

Sacre, S.M., and Moss, S.E. (2002). Intracellular localization of endothelial cell annexins is differentially regulated by oxidative stress. *Exp Cell Res* 274, 254-263.

Sampson, H.M., Robert, R., Liao, J., Matthes, E., Carlile, G.W., Hanrahan, J.W., and Thomas, D.Y. (2011). Identification of a NBD1-binding pharmacological chaperone that corrects the trafficking defect of F508del-CFTR. *Chem Biol* 18, 231-242.

Sato, S., Ward, C.L., Krouse, M.E., Wine, J.J., and Kopito, R.R. (1996). Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* 271, 635-638.

Saurin, W., Hofnung, M., and Dassa, E. (1999). Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 48, 22-41.

Scannell, M., Flanagan, M.B., deStefani, A., Wynne, K.J., Cagney, G., Godson, C., and Maderna, P. (2007). Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J Immunol* 178, 4595-4605.

Schally, A.V., Srkalovic, G., Szende, B., Redding, T.W., Janaky, T., Juhasz, A., Korkut, E., Cai, R.Z., Szepeshazi, K., Radulovic, S., et al. (1990). Antitumor effects of analogs of LH-RH and somatostatin: experimental and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 1061-1067.

Schang, A.L., Bleux, C., Chenut, M.C., Ngo-Muller, V., Querat, B., Jeanny, J.C., Counis, R., Cohen-Tannoudji, J., and Laverriere, J.N. (2012). Identification and Analysis of Two Novel Sites of Rat GnRH Receptor Gene Promoter Activity: The Pineal Gland and Retina. *Neuroendocrinology* 97, 115-31

Schillers, H., Shahin, V., Albermann, L., Schafer, C., and Oberleithner, H. (2004). Imaging CFTR: a tail to tail dimer with a central pore. *Cell Physiol Biochem* 14, 1-10.

Schotman, H., Karhinen, L., and Rabouille, C. (2008). dGRASP-mediated noncanonical integrin secretion is required for Drosophila epithelial remodeling. *Dev Cell* 14, 171-182.

Schreiber, R., Hopf, A., Mall, M., Greger, R., and Kunzelmann, K. (1999a). The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5310-5315.

Schreiber, R., Nitschke, R., Greger, R., and Kunzelmann, K. (1999b). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J Biol Chem* 274, 11811-11816.

Schreiber, R., Pavenstadt, H., Greger, R., and Kunzelmann, K. (2000). Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* 475, 291-295.

Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005a). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569, 29-63.

Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005b). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74, 739-789.

- Schroeder, B.C., Cheng, T., Jan, Y.N., and Jan, L.Y.** (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134, 1019-1029.
- Schwiebert, E.M.** (1999). ABC transporter-facilitated ATP conductive transport. *Am J Physiol* 276, C1-8.
- Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Egan, M.E., Stutts, M.J., and Guggino, W.B.** (1999). CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* 79, S145-166.
- Schwiebert, E.M., Egan, M.E., Hwang, T.H., Fulmer, S.B., Allen, S.S., Cutting, G.R., and Guggino, W.B.** (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81, 1063-1073.
- Schwiebert, E.M., Morales, M.M., Devidas, S., Egan, M.E., and Guggino, W.B.** (1998). Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2674-2679.
- Scotet, V., Dugueperoux, I., Saliou, P., Rault, G., Roussey, M., Audrezet, M.P., and Ferec, C.** (2010). Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France. *Orphanet J Rare Dis* 7, 14.
- Scott-Ward, T.S., and Amaral, M.D.** (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, 7097-7109.
- Seeburg, P.H., Mason, A.J., Stewart, T.A., and Nikolics, K.** (1987). The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Prog Horm Res* 43, 69-98.
- Seibert, F.S., Chang, X.B., Aleksandrov, A.A., Clarke, D.M., Hanrahan, J.W., and Riordan, J.R.** (1999). Influence of phosphorylation by protein kinase A on CFTR at the cell surface and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1461, 275-283.
- Sermet-Gaudelus, I., Boeck, K.D., Casimir, G.J., Vermeulen, F., Leal, T., Mogenet, A., Roussel, D., Fritsch, J., Hanssens, L., Hirawat, S., et al.** (2010a). Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182, 1262-1272.
- Sermet-Gaudelus, I., Girodon, E., Roussel, D., Deneuville, E., Bui, S., Huet, F., Guillot, M., Aboutaam, R., Renouil, M., Munck, A., et al.** (2010b). Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax* 65, 539-544.
- Serohijos, A.W., Hegedus, T., Aleksandrov, A.A., He, L., Cui, L., Dokholyan, N.V., and Riordan, J.R.** (2008). Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3256-3261.
- Setji, T.L., and Brown, A.J.** (2007). Comprehensive clinical management of polycystic ovary syndrome. *Minerva Med* 98, 175-189.
- Sharma, M., Pampinella, F., Nemes, C., Benharouga, M., So, J., Du, K., Bache, K.G., Papsin, B., Zerangue, N., Stenmark, H., et al.** (2004). Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol* 164, 923-933.
- Shead, E.F., Haworth, C.S., Condliffe, A.M., McKeon, D.J., Scott, M.A., and Compston, J.E.** (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 62, 650-651.
- Sheppard, D.N.** (2011). Cystic fibrosis: CFTR correctors to the rescue. *Chem Biol* 18, 145-147.
- Sheppard, D.N., and Welsh, M.J.** (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79, S23-45.
- Shibata, S., Sato, H., and Maki, M.** (1992). Calphobindin I (annexin V) inhibits protein kinase C. *Tohoku J Exp Med* 166, 479-481.
- Shibata, S., Sato, H., Ota, H., Karube, A., Takahashi, O., and Tanaka, T.** (1997). Involvement of annexin V in antiproliferative effects of gonadotropin-releasing hormone agonists on human endometrial cancer cell line. *Gynecol Oncol* 66, 217-221.
- Shimoji, T., Murakami, K., Sugiyama, Y., Matsuda, M., Inubushi, S., Nasu, J., Shirakura, M., Suzuki, T., Wakita, T., Kishino, T., et al.** (2009). Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem* 106, 1123-1135.
- Short, D.B., Trotter, K.W., Reczek, D., Kreda, S.M., Bretscher, A., Boucher, R.C., Stutts, M.J., and Milgram, S.L.** (1998). An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 19797-19801.
- Shwachman, H., Kulczycki, L.L., and Khaw, K.T.** (1965). A report on sixty-five patients over 17 years of age. *Pediatrics* 36, 689-699.
- Silvis, M.R., Bertrand, C.A., Ameen, N., Golin-Bisello, F., Butterworth, M.B., Frizzell, R.A., and Bradbury, N.A.** (2009). Rab11b regulates the apical recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in polarized intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 20, 2337-2350.

- Silvis, M.R., Picciano, J.A., Bertrand, C., Weixel, K., Bridges, R.J., and Bradbury, N.A.** (2003). A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator generates a novel internalization sequence and enhances endocytic rates. *J Biol Chem* 278, 11554-11560.
- Singh, A.K., Riederer, B., Krabbenhoft, A., Rausch, B., Bonhagen, J., Lehmann, U., de Jonge, H.R., Donowitz, M., Yun, C., Weinman, E.J., et al.** (2009). Differential roles of NHERF1, NHERF2, and PDZK1 in regulating CFTR-mediated intestinal anion secretion in mice. *J Clin Invest* 119, 540-550.
- Sion-Vardi, N., Kaneti, J., Segal-Abramson, T., Giat, J., Levy, J., and Sharoni, Y.** (1992). Gonadotropin-releasing hormone specific binding sites in normal and malignant renal tissue. *J Urol* 148, 1568-1570.
- Skach, W.R.** (2006). CFTR: new members join the fold. *Cell* 127, 673-675.
- Skrahina, T., Piljic, A., and Schultz, C.** (2008). Heterogeneity and timing of translocation and membrane-mediated assembly of different annexins. *Exp Cell Res* 314, 1039-1047.
- Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P., and Welsh, M.J.** (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85, 229-236.
- Smith, S.S., Liu, X., Zhang, Z.R., Sun, F., Kriewall, T.E., McCarty, N.A., and Dawson, D.C.** (2001). CFTR: covalent and noncovalent modification suggests a role for fixed charges in anion conduction. *J Gen Physiol* 118, 407-431.
- Sohma, H., Ohkawa, H., Akino, T., and Kuroki, Y.** (2001). Binding of annexins to lung lamellar bodies and the PMA-stimulated secretion of annexin V from alveolar type II cells. *J Biochem* 130, 449-455.
- Sokol, R.J., and Durie, P.R.** (1999). Recommendations for management of liver and biliary tract disease in cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Foundation Hepatobiliary Disease Consensus Group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 28 Suppl 1, S1-13.
- Solito, E., Raguenes-Nicol, C., de Coupade, C., Bisagni-Faure, A., and Russo-Marie, F.** (1998). U937 cells deprived of endogenous annexin 1 demonstrate an increased PLA2 activity. *Br J Pharmacol* 124, 1675-1683.
- Sondo, E., Tomati, V., Caci, E., Esposito, A.I., Pfeffer, U., Pedemonte, N., and Galletta, L.J.** (2011). Rescue of the mutant CFTR chloride channel by pharmacological correctors and low temperature analyzed by gene expression profiling. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, C872-885.
- Sopkova-de Oliveira Santos, J., Oling, F.K., Rety, S., Brisson, A., Smith, J.C., and Lewit-Bentley, A.** (2000). S100 protein-annexin interactions: a model of the (Anx2-p11)(2) heterotetramer complex. *Biochim Biophys Acta* 1498, 181-191.
- Sopkova, J., Renouard, M., and Lewit-Bentley, A.** (1993). The crystal structure of a new high-calcium form of annexin V. *J Mol Biol* 234, 816-825.
- Sopkova, J., Vincent, M., Takahashi, M., Lewit-Bentley, A., and Gallay, J.** (1999). Conformational flexibility of domain III of annexin V at membrane/water interfaces. *Biochemistry* 38, 5447-5458.
- Stahlman, M.T., and Gray, M.E.** (1984). Ontogeny of neuroendocrine cells in human fetal lung. I. An electron microscopic study. *Lab Invest* 51, 449-463.
- Steingold, K., De Ziegler, D., Cedars, M., Meldrum, D.R., Lu, J.K., Judd, H.L., and Chang, R.J.** (1987). Clinical and hormonal effects of chronic gonadotropin-releasing hormone agonist treatment in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 65, 773-778.
- Steinhardt, R.A., Bi, G., and Alderton, J.M.** (1994). Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* 263, 390-393.
- Sterling, K.M., Jr., Shah, S., Kim, R.J., Johnston, N.I., Salikhova, A.Y., and Abraham, E.H.** (2004). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human and mouse red blood cell membranes and its interaction with ecto-apyrase. *J Cell Biochem* 91, 1174-1182.
- Stern, R.C., Boat, T.F., Doershuk, C.F., Tucker, A.S., Primiano, F.P., Jr., and Matthews, L.W.** (1976). Course of cystic fibrosis in 95 patients. *J Pediatr* 89, 406-411.
- Stratford, F.L., Ramjeesingh, M., Cheung, J.C., Huan, L.J., and Bear, C.E.** (2007). The Walker B motif of the second nucleotide-binding domain (NBD2) of CFTR plays a key role in ATPase activity by the NBD1-NBD2 heterodimer. *Biochem J* 401, 581-586.
- Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C., and Boucher, R.C.** (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269, 847-850.
- Suaud, L., Miller, K., Panichelli, A.E., Randell, R.L., Marando, C.M., and Rubenstein, R.C.** (2011). 4-Phenylbutyrate stimulates Hsp70 expression through the E1p2 component of elongator and STAT-3 in cystic fibrosis epithelial cells. *J Biol Chem* 286, 45083-45092.
- Sugita, M., Yue, Y., and Foskett, J.K.** (1998). CFTR Cl⁻ channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J* 17, 898-908.

- Sun, F., Hug, M.J., Lewarchik, C.M., Yun, C.H., Bradbury, N.A., and Frizzell, R.A.** (2000). E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J Biol Chem* 275, 29539-29546.
- Sun, F., Mi, Z., Condliffe, S.B., Bertrand, C.A., Gong, X., Lu, X., Zhang, R., Latoche, J.D., Pilewski, J.M., Robbins, P.D., et al.** (2008). Chaperone displacement from mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator restores its function in human airway epithelia. *FASEB J* 22, 3255-3263.
- Sundaram, S., Roy, S.K., and Kompella, U.B.** (2009a). Differential expression of LHRH-receptor in bovine nasal tissue and its role in deslorelin delivery. *Peptides* 30, 351-358.
- Sundaram, S., Trivedi, R., Durairaj, C., Ramesh, R., Ambati, B.K., and Kompella, U.B.** (2009b). Targeted drug and gene delivery systems for lung cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15, 7299-7308.
- Sunday, M.E., Hua, J., Dai, H.B., Nusrat, A., and Torday, J.S.** (1990). Bombesin increases fetal lung growth and maturation in utero and in organ culture. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3, 199-205.
- Super, M., Schwarz, M.J., Malone, G., Roberts, T., Haworth, A., and Dermody, G.** (1994). Active cascade testing for carriers of cystic fibrosis gene. *BMJ* 308, 1462-1467.
- Swairjo, M.A., Concha, N.O., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R., and Seaton, B.A.** (1995). Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat Struct Biol* 2, 968-974.
- Swairjo, M.A., and Seaton, B.A.** (1994). Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23, 193-213.
- Swanson, J.** (2006). CFTR: helping to acidify macrophage lysosomes. *Nat Cell Biol* 8, 908-909.
- Swiatecka-Urban, A., Boyd, C., Coutermarsh, B., Karlson, K.H., Barnaby, R., Aschenbrenner, L., Langford, G.M., Hasson, T., and Stanton, B.A.** (2004). Myosin VI regulates endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 279, 38025-38031.
- Swiatecka-Urban, A., Brown, A., Moreau-Marquis, S., Renuka, J., Coutermarsh, B., Barnaby, R., Karlson, K.H., Flotte, T.R., Fukuda, M., Langford, G.M., et al.** (2005). The short apical membrane half-life of rescued {Delta}F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of {Delta}F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells. *J Biol Chem* 280, 36762-36772.
- Swiatecka-Urban, A., Duhaime, M., Coutermarsh, B., Karlson, K.H., Collawn, J., Milewski, M., Cutting, G.R., Guggino, W.B., Langford, G., and Stanton, B.A.** (2002). PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 277, 40099-40105.
- Szepeshazi, K., Schally, A.V., and Halmos, G.** (2007). LH-RH receptors in human colorectal cancers: unexpected molecular targets for experimental therapy. *Int J Oncol* 30, 1485-1492.

T

- Tabcharani, J.A., Chang, X.B., Riordan, J.R., and Hanrahan, J.W.** (1991). Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352, 628-631.
- Tabcharani, J.A., Linsdell, P., and Hanrahan, J.W.** (1997). Halide permeation in wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels. *J Gen Physiol* 110, 341-354.
- Taratula, O., Garbuzenko, O.B., Chen, A.M., and Minko, T.** (2011). Innovative strategy for treatment of lung cancer: targeted nanotechnology-based inhalation co-delivery of anticancer drugs and siRNA. *J Drug Target* 19, 900-914.
- Tarran, R.** (2004). Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc Am Thorac Soc* 1, 42-46.
- Tarran, R., Grubb, B.R., Gatzky, J.T., Davis, C.W., and Boucher, R.C.** (2001). The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J Gen Physiol* 118, 223-236.
- Tarran, R., Loewen, M.E., Paradiso, A.M., Olsen, J.C., Gray, M.A., Argent, B.E., Boucher, R.C., and Gabriel, S.E.** (2002). Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca²⁺-activated Cl⁻ conductances. *J Gen Physiol* 120, 407-418.
- Taulan, M., Girardet, A., Guittard, C., Altieri, J.P., Templin, C., Beroud, C., des Georges, M., and Claustres, M.** (2007). Large genomic rearrangements in the CFTR gene contribute to CBAVD. *BMC Med Genet* 8, 22.
- Thelin, W.R., Chen, Y., Gentzsch, M., Kreda, S.M., Sallee, J.L., Scarlett, C.O., Borchers, C.H., Jacobson, K., Stutts, M.J., and Milgram, S.L.** (2007). Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J Clin Invest* 117, 364-374.
- Thelin, W.R., Kesimer, M., Tarran, R., Kreda, S.M., Grubb, B.R., Sheehan, J.K., Stutts, M.J., and Milgram, S.L.** (2005). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is regulated by a direct interaction with the protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 280, 41512-41520.

Thibodeau, P.H., Brautigam, C.A., Machius, M., and Thomas, P.J. (2005). Side chain and backbone contributions of Phe508 to CFTR folding. *Nat Struct Mol Biol* 12, 10-16.

Thibodeau, P.H., Richardson, J.M., 3rd, Wang, W., Millen, L., Watson, J., Mendoza, J.L., Du, K., Fischman, S., Senderowitz, H., Lukacs, G.L., et al. (2010). The cystic fibrosis-causing mutation deltaF508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *J Biol Chem* 285, 35825-35835.

Thoreau, V., Berges, T., Callebaut, I., Guillier-Gencik, Z., Gressin, L., Bernheim, A., Karst, F., Mornon, J.P., Kitzis, A., and Chomel, J.C. (1999). Molecular cloning, expression analysis, and chromosomal localization of human syntaxin 8 (STX8). *Biochem Biophys Res Commun* 257, 577-583.

Tizzano, E.F., Silver, M.M., Chitayat, D., Benichou, J.C., and Buchwald, M. (1994). Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissues. Clues for the infertility in patients with cystic fibrosis. *Am J Pathol* 144, 906-914.

Tokumitsu, H., Mizutani, A., Minami, H., Kobayashi, R., and Hidaka, H. (1992). A calyculin-associated protein is a newly identified member of the Ca²⁺/phospholipid-binding proteins, annexin family. *J Biol Chem* 267, 8919-8924.

Tomblin, G., Bartholomew, L.A., Urbatsch, I.L., and Senior, A.E. (2004). Combined mutation of catalytic glutamate residues in the two nucleotide binding domains of P-glycoprotein generates a conformation that binds ATP and ADP tightly. *J Biol Chem* 279, 31212-31220.

Treharne, K.J., Crawford, R.M., Xu, Z., Chen, J.H., Best, O.G., Schulte, E.A., Gruenert, D.C., Wilson, S.M., Sheppard, D.N., Kunzelmann, K., et al. (2007). Protein kinase CK2, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, and the deltaF508 mutation: F508 deletion disrupts a kinase-binding site. *J Biol Chem* 282, 10804-10813.

Treharne, K.J., Xu, Z., Chen, J.H., Best, O.G., Cassidy, D.M., Gruenert, D.C., Hegyi, P., Gray, M.A., Sheppard, D.N., Kunzelmann, K., et al. (2009). Inhibition of protein kinase CK2 closes the CFTR Cl channel, but has no effect on the cystic fibrosis mutant deltaF508-CFTR. *Cell Physiol Biochem* 24, 347-360.

Treize, A.E., Chambers, J.A., Wardle, C.J., Gould, S., and Harris, A. (1993). Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Hum Mol Genet* 2, 213-218.

Trouve, P., Kerbirou, M., le Hir, S., Benz, N., and Ferec, C. (2012). Surface plasmon resonance shows a gender difference in circulating annexin A5 in human. *Talanta* 93, 219-223.

Trouve, P., Le Drevo, M.A., Kerbirou, M., Friocourt, G., Fichou, Y., Gillet, D., and Ferec, C. (2007). Annexin V is directly involved in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's chloride channel function. *Biochim Biophys Acta* 1772, 1121-1133.

Tsai, M.F., Li, M., and Hwang, T.C. (2010). Stable ATP binding mediated by a partial NBD dimer of the CFTR chloride channel. *J Gen Physiol* 135, 399-414.

Tsui, L.C., Buchwald, M., Barker, D., Braman, J.C., Knowlton, R., Schumm, J.W., Eiberg, H., Mohr, J., Kennedy, D., Plavsic, N., et al. (1985). Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230, 1054-1057.

Tsutsumi, M., Zhou, W., Millar, R.P., Mellon, P.L., Roberts, J.L., Flanagan, C.A., Dong, K., Gillo, B., and Sealfon, S.C. (1992). Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6, 1163-1169.

Tureck, R.W., Mastroianni, L., Jr., Blasco, L., and Strauss, J.F., 3rd (1982). Inhibition of human granulosa cell progesterone secretion by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *J Clin Endocrinol Metab* 54, 1078-1080.

Turnay, J., Pfannmuller, E., Lizarbe, M.A., Bertling, W.M., and von der Mark, K. (1995). Collagen binding activity of recombinant and N-terminally modified annexin V (anchurin CII). *J Cell Biochem* 58, 208-220.

Tzima, E., Trotter, P.J., Orchard, M.A., and Walker, J.H. (1999). Annexin V binds to the actin-based cytoskeleton at the plasma membrane of activated platelets. *Exp Cell Res* 251, 185-193.

Tzima, E., Trotter, P.J., Orchard, M.A., and Walker, J.H. (2000). Annexin V relocates to the platelet cytoskeleton upon activation and binds to a specific isoform of actin. *Eur J Biochem* 267, 4720-4730.

Tzima, E., and Walker, J.H. (2000). Platelet annexin V: the ins and outs. *Platelets* 11, 245-251.

U

Utsumi, T. (1992). [Inhibitory effects of calphobindins on phospholipase A2 and phospholipase C]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 44, 793-799.

V

Valentine, C.D., Lukacs, G.L., Verkman, A.S., and Haggie, P.M. (2012). Reduced PDZ interactions of rescued DeltaF508CFTR increases its cell surface mobility. *J Biol Chem* 287, 43630-43638.

- van de Graaf, S.F., Hoenderop, J.G., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B., and Bindels, R.J. (2003). Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J* 22, 1478-1487.
- van den Eijnde, S.M., van den Hoff, M.J., Reutelingsperger, C.P., van Heerde, W.L., Henfling, M.E., Vermeij-Keers, C., Schutte, B., Borgers, M., and Ramaekers, F.C. (2001). Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J Cell Sci* 114, 3631-3642.
- van Genderen, H.O., Kenis, H., Hofstra, L., Narula, J., and Reutelingsperger, C.P. (2008). Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* 1783, 953-963.
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P.D., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., Turnbull, A., Singh, A., Joubbran, J., Hazlewood, A., et al. (2009). Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18825-18830.
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P.D., Burton, B., Stack, J.H., Straley, K.S., Decker, C.J., Miller, M., McCartney, J., Olson, E.R., 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, 18843-18848.
- Van Goor, F., Straley, K.S., Cao, D., Gonzalez, J., Hadida, S., Hazlewood, A., Joubbran, J., Knapp, T., Makings, L.R., Miller, M., et al. (2006). Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L1117-1130.
- van Heerde, W.L., Poort, S., van 't Veer, C., Reutelingsperger, C.P., and de Groot, P.G. (1994). Binding of recombinant annexin V to endothelial cells: effect of annexin V binding on endothelial-cell-mediated thrombin formation. *Biochem J* 302 (Pt 1), 305-312.
- van Meegen, M.A., Terheggen-Lagro, S.W., Koymans, K.J., van der Ent, C.K., and Beekman, J.M. (2013). Apical CFTR Expression in Human Nasal Epithelium Correlates with Lung Disease in Cystic Fibrosis. *PLoS One* 8, e57617.
- van Tits, L.J., van Heerde, W.L., van der Vleuten, G.M., de Graaf, J., Grobbee, D.E., van de Vijver, L.P., Stalenhoef, A.F., and Princen, H.M. (2007). Plasma annexin A5 level relates inversely to the severity of coronary stenosis. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 674-680.
- Varga, K., Goldstein, R.F., Jurkuvenaite, A., Chen, L., Matalon, S., Sorscher, E.J., Bebok, Z., and Collawn, J.F. (2008). Enhanced cell-surface stability of rescued DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by pharmacological chaperones. *Biochem J* 410, 555-564.
- Varga, K., Jurkuvenaite, A., Wakefield, J., Hong, J.S., Guimbellot, J.S., Venglarik, C.J., Niraj, A., Mazur, M., Sorscher, E.J., Collawn, J.F., et al. (2004). Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J Biol Chem* 279, 22578-22584.
- Varticovski, L., Chahwala, S.B., Whitman, M., Cantley, L., Schindler, D., Chow, E.P., Sinclair, L.K., and Pepinsky, R.B. (1988). Location of sites in human lipocortin I that are phosphorylated by protein tyrosine kinases and protein kinases A and C. *Biochemistry* 27, 3682-3690.
- Vastiau, A., Cao, L., Jaspers, M., Owsianik, G., Janssens, V., Cuppens, H., Goris, J., Nilius, B., and Cassiman, J.J. (2005). Interaction of the protein phosphatase 2A with the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel. *FEBS Lett* 579, 3392-3396.
- Veeze, H.J., Sinaasappel, M., Bijman, J., Bouquet, J., and de Jonge, H.R. (1991). Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology* 101, 398-403.
- Vennekens, R., Trouet, D., Vankeerberghen, A., Voets, T., Cuppens, H., Eggermont, J., Cassiman, J.J., Droogmans, G., and Nilius, B. (1999). Inhibition of volume-regulated anion channels by expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Physiol* 515 (Pt 1), 75-85.
- Vergani, P., Lockless, S.W., Nairn, A.C., and Gadsby, D.C. (2005). CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* 433, 876-880.
- Verhaeghe, C., Remouchamps, C., Hennuy, B., Vanderplasschen, A., Chariot, A., Tabruyn, S.P., Oury, C., and Bours, V. (2007). Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. *Biochem Pharmacol* 73, 1982-1994.
- Vij, N., Mazur, S., and Zeitlin, P.L. (2009). CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS One* 4, e4664.
- Voges, D., Berendes, R., Burger, A., Demange, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1994). Three-dimensional structure of membrane-bound annexin V. A correlative electron microscopy-X-ray crystallography study. *J Mol Biol* 238, 199-213.
- von der Mark, K., and Mollenhauer, J. (1997). Annexin V interactions with collagen. *Cell Mol Life Sci* 53, 539-545.

W

- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945-951.

- Walker, L.C., Venglarik, C.J., Aubin, G., Weatherly, M.R., McCarty, N.A., Lesnick, B., Ruiz, F., Clancy, J.P., and Sorscher, E.J.** (1997). Relationship between airway ion transport and a mild pulmonary disease mutation in CFTR. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1684-1689.
- Wang, C., Protasevich, I., Yang, Z., Seehausen, D., Skalak, T., Zhao, X., Atwell, S., Spencer Emtage, J., Wetmore, D.R., Brouillette, C.G., et al.** (2010a). Integrated biophysical studies implicate partial unfolding of NBD1 of CFTR in the molecular pathogenesis of F508del cystic fibrosis. *Protein Sci* 19, 1932-1947.
- Wang, C., Wang, J., Guo, H.F., and Liu, R.Y.** (2007). Involvement of annexin I in the dexamethasone-mediated upregulation of A549 cells phagocytosis of apoptotic eosinophils. *Immunol Lett* 111, 103-110.
- Wang, F., Zeltwanger, S., Hu, S., and Hwang, T.C.** (2000a). Deletion of phenylalanine 508 causes attenuated phosphorylation-dependent activation of CFTR chloride channels. *J Physiol* 524 Pt 3, 637-648.
- Wang, K., and Singer, S.J.** (1977). Interaction of filamin with f-actin in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2021-2025.
- Wang, S., Yue, H., Derin, R.B., Guggino, W.B., and Li, M.** (2000b). Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 103, 169-179.
- Wang, W., Bernard, K., Li, G., and Kirk, K.L.** (2007a). Curcumin opens cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by a novel mechanism that requires neither ATP binding nor dimerization of the nucleotide-binding domains. *J Biol Chem* 282, 4533-4544.
- Wang, W., and Creutz, C.E.** (1992). Regulation of the chromaffin granule aggregating activity of annexin I by phosphorylation. *Biochemistry* 31, 9934-9939.
- Wang, W., and Kirsch, T.** (2002). Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *J Cell Biol* 157, 1061-1069.
- Wang, W., and Linsdell, P.** (2012). Alternating access to the transmembrane domain of the ATP-binding cassette protein cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7). *J Biol Chem* 287, 10156-10165.
- Wang, W., Okeyo, G.O., Tao, B., Hong, J.S., and Kirk, K.L.** (2011). Thermally unstable gating of the most common cystic fibrosis mutant channel (DeltaF508): "rescue" by suppressor mutations in nucleotide binding domain 1 and by constitutive mutations in the cytosolic loops. *J Biol Chem* 286, 41937-41948.
- Wang, W., Wu, J., Bernard, K., Li, G., Wang, G., Bevensee, M.O., and Kirk, K.L.** (2010b). ATP-independent CFTR channel gating and allosteric modulation by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3888-3893.
- Wang, W., Xu, J., and Kirsch, T.** (2003). Annexin-mediated Ca²⁺ influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J Biol Chem* 278, 3762-3769.
- Wang, W., Xu, J., and Kirsch, T.** (2005). Annexin V and terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Exp Cell Res* 305, 156-165.
- Wang, X., Matteson, J., An, Y., Moyer, B., Yoo, J.S., Bannykh, S., Wilson, I.A., Riordan, J.R., and Balch, W.E.** (2004). COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol* 167, 65-74.
- Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D.M., Koulov, A.V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H., et al.** (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 127, 803-815.
- Wang, Y., Loo, T.W., Bartlett, M.C., and Clarke, D.M.** (2007b). Additive effect of multiple pharmacological chaperones on maturation of CFTR processing mutants. *Biochem J* 406, 257-263.
- Ward, C.L., and Kopito, R.R.** (1994). Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* 269, 25710-25718.
- Ward, C.L., Omura, S., and Kopito, R.R.** (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83, 121-127.
- Weixel, K.M., and Bradbury, N.A.** (2000). The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J Biol Chem* 275, 3655-3660.
- Weixel, K.M., and Bradbury, N.A.** (2001a). Endocytic adaptor complexes bind the C-terminal domain of CFTR. *Pflugers Arch* 443 Suppl 1, S70-74.
- Weixel, K.M., and Bradbury, N.A.** (2001b). Mu 2 binding directs the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the clathrin-mediated endocytic pathway. *J Biol Chem* 276, 46251-46259.
- Welsh, M.J.** (1986). An apical-membrane chloride channel in human tracheal epithelium. *Science* 232, 1648-1650.
- Welsh, M.J., and Smith, A.E.** (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73, 1251-1254.

Wen, Y., Edelman, J.L., Kang, T., and Sachs, G. (1999). Lipocortin V may function as a signaling protein for vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 713-721.

Weng, X., Luecke, H., Song, I.S., Kang, D.S., Kim, S.H., and Huber, R. (1993). Crystal structure of human annexin I at 2.5 Å resolution. *Protein Sci* 2, 448-458.

Weyler, R.T., Yurko-Mauro, K.A., Rubenstein, R., Kollen, W.J., Reenstra, W., Altschuler, S.M., Egan, M., and Mulberg, A.E. (1999). CFTR is functionally active in GnRH-expressing GT1-7 hypothalamic neurons. *Am J Physiol* 277, C563-571.

White, R.B., Eisen, J.A., Kasten, T.L., and Fernald, R.D. (1998). Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 305-309.

Wilkinson, D.J., Strong, T.V., Mansoura, M.K., Wood, D.L., Smith, S.S., Collins, F.S., and Dawson, D.C. (1997). CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Am J Physiol* 273, L127-133.

Wilschanski, M., Miller, L.L., Shoseyov, D., Blau, H., Rivlin, J., Aviram, M., Cohen, M., Armoni, S., Yaakov, Y., Pugatsch, T., et al. (2011). Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur Respir J* 38, 59-69.

Wilschanski, M., Yahav, Y., Yaakov, Y., Blau, H., Bentur, L., Rivlin, J., Aviram, M., Bdolah-Abram, T., Bebok, Z., Shushi, L., et al. (2003). Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 349, 1433-1441.

Wilson, A.C., Meethal, S.V., Bowen, R.L., and Atwood, C.S. (2007). Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 1851-1863.

Wilson, A.C., Salamat, M.S., Haas, R.J., Roche, K.M., Karande, A., Meethal, S.V., Terasawa, E., Bowen, R.L., and Atwood, C.S. (2006). Human neurons express type I GnRH receptor and respond to GnRH I by increasing luteinizing hormone expression. *J Endocrinol* 191, 651-663.

Witt, H. (2003). Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. *Gut* 52 Suppl 2, ii31-41.

Wolde, M., Fellows, A., Cheng, J., Kivenson, A., Coutermarsh, B., Talebian, L., Karlson, K., Piserchio, A., Mierke, D.F., Stanton, B.A., et al. (2007). Targeting CAL as a negative regulator of DeltaF508-CFTR cell-surface expression: an RNA interference and structure-based mutagenetic approach. *J Biol Chem* 282, 8099-8109.

Wolfahrt, S., Kleine, B., and Rossmannith, W.G. (1998). Detection of gonadotrophin releasing hormone and its receptor mRNA in human placental trophoblasts using in-situ reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol Hum Reprod* 4, 999-1006.

Wu, L.N., Wuthier, M.G., Genge, B.R., and Wuthier, R.E. (1997). In situ levels of intracellular Ca²⁺ and pH in avian growth plate cartilage. *Clin Orthop Relat Res*, 310-324.

X

Xu, Y., Clark, J.C., Aronow, B.J., Dey, C.R., Liu, C., Wooldridge, J.L., and Whitsett, J.A. (2003). Transcriptional adaptation to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficiency. *J Biol Chem* 278, 7674-7682.

Y

Yajima, T., Nagashima, H., Tsutsumi-Sakai, R., Hagiwara, N., Hosoda, S., Quertermous, T., Kasanuki, H., and Kawana, M. (1997). Functional activity of the CFTR Cl⁻ channel in human myocardium. *Heart Vessels* 12, 255-261.

Yamamoto, H., Sato, H., Shibata, S., Murata, M., Fukuda, J., and Tanaka, T. (2001). Involvement of annexin V in the antiproliferative effect of GnRH agonist on cultured human uterine leiomyoma cells. *Mol Hum Reprod* 7, 169-173.

Yang, Y., Janich, S., Cohn, J.A., and Wilson, J.M. (1993). The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9480-9484.

Yang, Y.D., Cho, H., Koo, J.Y., Tak, M.H., Cho, Y., Shim, W.S., Park, S.P., Lee, J., Lee, B., Kim, B.M., et al. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210-1215.

Yao, B., and Kawaminami, M. (2008). Stimulation of annexin A5 expression by gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the Leydig cells of rats. *J Reprod Dev* 54, 259-264.

Yin, H., Cheng, K.W., Hwa, H.L., Peng, C., Auersperg, N., and Leung, P.C. (1998). Expression of the messenger RNA for gonadotropin-releasing hormone and its receptor in human cancer cell lines. *Life Sci* 62, 2015-2023.

Yoo, D., Flagg, T.P., Olsen, O., Raghuram, V., Foskett, J.K., and Welling, P.A. (2004). Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* 279, 6863-6873.

Yoo, J.S., Moyer, B.D., Bannykh, S., Yoo, H.M., Riordan, J.R., and Balch, W.E. (2002). Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem* 277, 11401-11409.

Yoshimura, K., Nakamura, H., Trapnell, B.C., Chu, C.S., Dalemans, W., Pavirani, A., Lecocq, J.P., and Crystal, R.G. (1991a). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. *Nucleic Acids Res* 19, 5417-5423.

Yoshimura, K., Nakamura, H., Trapnell, B.C., Dalemans, W., Pavirani, A., Lecocq, J.P., and Crystal, R.G. (1991b). The cystic fibrosis gene has a "housekeeping"-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin. *J Biol Chem* 266, 9140-9144.

Younger, J.M., Chen, L., Ren, H.Y., Rosser, M.F., Turnbull, E.L., Fan, C.Y., Patterson, C., and Cyr, D.M. (2006). Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* 126, 571-582.

Younger, J.M., Ren, H.Y., Chen, L., Fan, C.Y., Fields, A., Patterson, C., and Cyr, D.M. (2004). A foldable CFTR{Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. *J Cell Biol* 167, 1075-1085.

Yu, W., Kim Chiaw, P., and Bear, C.E. (2011). Probing conformational rescue induced by a chemical corrector of F508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutant. *J Biol Chem* 286, 24714-24725.

Yu, Y., Platoshyn, O., Safrina, O., Tsigelny, I., Yuan, J.X., and Keller, S.H. (2007). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) functionality is dependent on coatomer protein I (COPI). *Biol Cell* 99, 433-444.

Z

Zeitlin, P.L., Boyle, M.P., Guggino, W.B., and Molina, L. (2004). A phase I trial of intranasal Moli1901 for cystic fibrosis. *Chest* 125, 143-149.

Zeitlin, P.L., Diener-West, M., Rubenstein, R.C., Boyle, M.P., Lee, C.K., and Brass-Ernst, L. (2002). Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate. *Mol Ther* 6, 119-126.

Zeltwanger, S., Wang, F., Wang, G.T., Gillis, K.D., and Hwang, T.C. (1999). Gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by adenosine triphosphate hydrolysis. Quantitative analysis of a cyclic gating scheme. *J Gen Physiol* 113, 541-554.

Zerhusen, B., Zhao, J., Xie, J., Davis, P.B., and Ma, J. (1999). A single conductance pore for chloride ions formed by two cystic fibrosis transmembrane conductance regulator molecules. *J Biol Chem* 274, 7627-7630.

Zhang, L., Aleksandrov, L.A., Riordan, J.R., and Ford, R.C. (2010). Domain location within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein investigated by electron microscopy and gold labelling. *Biochim Biophys Acta* 1808, 399-404.

Zhang, W., Penmatsa, H., Ren, A., Punchihewa, C., Lemoff, A., Yan, B., Fujii, N., and Naren, A.P. (2011). Functional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-containing macromolecular complexes: a small-molecule inhibitor approach. *Biochem J* 435, 451-462.

Zhang, X.L., Zhang, D., Michel, F.J., Blum, J.L., Simmen, F.A., and Simmen, R.C. (2003). Selective interactions of Kruppel-like factor 9/basic transcription element-binding protein with progesterone receptor isoforms A and B determine transcriptional activity of progesterone-responsive genes in endometrial epithelial cells. *J Biol Chem* 278, 21474-21482.

Zhang, Z.R., McDonough, S.I., and McCarty, N.A. (2000). Interaction between permeation and gating in a putative pore domain mutant in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biophys J* 79, 298-313.

Zhou, J.J., Li, M.S., Qi, J., and Linsdell, P. (2010). Regulation of conductance by the number of fixed positive charges in the intracellular vestibule of the CFTR chloride channel pore. *J Gen Physiol* 135, 229-245.

Zhou, Z., Wang, X., Liu, H.Y., Zou, X., Li, M., and Hwang, T.C. (2006). The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J Gen Physiol* 128, 413-422.

Zhu, T., Dahan, D., Evagelidis, A., Zheng, S., Luo, J., and Hanrahan, J.W. (1999). Association of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 274, 29102-29107.

Zielenski, J. (2000). Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67, 117-133.

CURRICULUM VITAE ET TRAVAUX

Nathalie BENZ

Rospirou
29590 Saint-Ségar

Tél : 06 66 23 02 64
nathalie.benz@inserm.fr

30 ans

FORMATION

- depuis fin 2009 : **Doctorat en Biologie-Santé**, ED-SICMA, UBO, Brest
- 2005-2006 : **Master 2 professionnel « Biotechnologies et Bio-Santé »**, UBO, Brest
- 2003-2005 : **Licence et Maîtrise IUP Ingénierie de la Santé**, spécialisation Génie Analytique et Biotechnologies, UM1, Montpellier
- 2001-2003 : **DUT Génie Biologique**, option Analyses Biologiques et Biochimiques, UBO, Quimper

EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES

- depuis fin 2009 : **Doctorante au sein de l'Inserm UMR 1078**, Brest
→ Laboratoire d'accueil : Inserm UMR 1078 « Génétique, Génomique Fonctionnelle et Biotechnologies », directeur Pr Claude FÉREC
→ Thème de recherche : Modulation de l'expression de l'annexine A5 par la *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) dans des lignées épithéliales bronchiques humaines : conséquences sur la protéine CFTR
- depuis fin 2006 : **Ingénieur d'études au sein de l'Inserm UMR 1078**, Brest (CDI)
→ Laboratoire d'accueil : Inserm UMR 1078 « Génétique, Génomique Fonctionnelle et Biotechnologies », directeur Pr Claude FÉREC
- 2006 : **Stage de Master 2 à Ifremer, UMR 6197**, Brest (8 mois)
→ Laboratoire d'accueil : UMR 6197 « LM2E, Microbiologie des Extrémophiles », directrice Anne GODFROY
→ Thème du stage : Recherche de nouveaux partenaires d'interaction du complexe de réplication de l'ADN chez l'Archée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi*
- 2005 : **Stage de Maîtrise à la Station de Biologie Marine et Marinarium de Concarneau**, (5 mois)
→ Laboratoire d'accueil : Unité Scientifique MNHN 0405 « Biominéralisation », directeur Dominique DOUMENC
→ Thème du stage : Recherche et caractérisation de molécules apparentées aux peptides calciotropes dans des hydrolysats de poissons
- 2003 : **Stage de DUT 2^{ème} année à la Station de Biologie Marine et Marinarium de Concarneau**, (3 mois)
→ Laboratoire d'accueil : Unité Scientifique MNHN 0405 « Biominéralisation », directeur Dominique DOUMENC
→ Thème du stage : Purification et identification de molécules apparentées au CGRP chez l'huître perlière géante *Pinctada margaritifera*

COMPÉTENCES TECHNIQUES

- **Biologie moléculaire** : extraction/purification/dosage d'ADN et d'ARN, RT-PCR, PCR, PCR en temps réel (qPCR), séquençage
- **Bactériologie** : clonage moléculaire, production et purification plasmidique
- **Culture cellulaire** : entretien de lignées cellulaires (P2), transfections transitoires (plasmides, siRNA)
- **Biochimie** : production de protéines et purification, extraction et dosage protéique, Western blot, électrophorèse 1D et 2D, co-immunoprécipitation
- **Microcytofluorométrie dynamique** : mesure des efflux d'halogénures (marqueur SPQ)
- **Immunofluorescence** : immunocytochimie
- **Résonance plasmonique de surface (SPR)** : technologie Biacore 3000

LANGUES / INFORMATIQUE

- **Langues pratiquées** : Anglais (lu, écrit, parlé) et Allemand (notions)
- **Informatique** : Word, Excel, Powerpoint, outils statistiques (STATGRAPHICS)

PUBLICATIONS

(revues scientifiques à comité de lecture)

- **Benz, N.**, Le Hir, S., Norez, C., Kerbiriou, M., Calvez, M.L., Becq, F., Trouvé, P., and Férec, C. (2013). Improvement of chloride transport defect by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cystic fibrosis epithelial cells. [actuellement en révision dans le journal *Plos One* (PONE-D-13-36018)].
- Trouvé, P., Kerbiriou, M., Teng, L., **Benz, N.**, Taiya, M., Le Hir, S., and Férec, C. (2013). Actin is not involved in the altered chloride channel activity of G551D-CFTR. [actuellement en révision dans le journal *BMC Research Notes* (MS ID : 1553162555964716)].
- Teng, L., Kerbiriou, M., Taiya, M., Le Hir, S., Mignen, O., **Benz, N.**, Trouvé, P., and Férec, C. (2012). Proteomic identification of calumenin as a G551D-CFTR associated protein. *PLoS One* 7, e40173.
- Trouvé, P., Kerbiriou, M., Le Hir, S., **Benz, N.**, and Férec, C. (2012). Surface plasmon resonance shows a gender difference in circulating annexin A5 in human. *Talanta* 93, 219-223.
- Kerbiriou, M., Teng, L., **Benz, N.**, Trouvé, P., and Férec, C. (2009). The calpain, caspase 12, caspase 3 cascade leading to apoptosis is altered in F508del-CFTR expressing cells. *PLoS One* 4, e8436.
- Le Drévo, M.A., **Benz, N.**, Kerbiriou, M., Giroux-Metges, M.A., Pennec, J.P., Trouvé, P., and Férec, C. (2008). Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator. *Biochim Biophys Acta* 1782, 605-614.

COMMUNICATIONS ORALES

- Benz, N. (2010). Modulation de l'expression de l'annexine A5 par la gonadolibérine : conséquences au niveau de la protéine F508del-CFTR ? **Journée des Doctorants et Post-Doctorants en Biologie-Santé en Bretagne**. Rennes, France.
- Benz, N. (2009). Correction of F508del-CFTR function by *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) in epithelial cells. **32th European Cystic Fibrosis Society Conference**. Brest, France.
- Benz, N. (2009). Modulation de l'expression de l'annexine A5 par la GnRH : conséquences au niveau de la protéine F508del-CFTR ? **Journée Jeunes Chercheurs – Faculté de médecine**. Brest, France.

COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

- Benz, N., Le Hir, S., Norez, C., Becq, F., Trouvé, P., and Férec, C. (2013). Modulation of annexin A5 expression by GnRH in human bronchial epithelial cell lines : consequences on the CFTR protein. **European Cystic Fibrosis Society, Basic Science Conference**. Malaga, Espagne.
→ Obtention d'un « Travel Grant » par l'association Vaincre La Mucoviscidose
- Benz, N., Trouvé, P., and Férec, C. (2012). Modulation of annexin A5 expression by *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) in human bronchial epithelial cell lines : consequences on the CFTR protein. **European Cystic Fibrosis Society, Basic Science Conference**. Sainte-Maxime, France.
→ Obtention d'un « Travel Grant » par l'association Vaincre La Mucoviscidose
- Benz, N., Kerbiriou, M., Gillet, D., Trouvé, P., and Férec, C. (2011). Modulation de l'expression de l'annexine A5 par la gonadolibérine : conséquences sur la protéine F508del-CFTR. **Journée des Doctorants de l'École Doctorale SICMA – UFR Sciences et Techniques**. Brest, France.
- Benz, N., Kerbiriou, M., Gillet, D., Trouvé, P., and Férec, C. (2011). Modulation de l'expression de l'annexine A5 par la gonadolibérine : conséquences sur la protéine F508del-CFTR. **12^{ème} Colloque des Jeunes Chercheurs, organisé par l'association Vaincre La Mucoviscidose**. Paris, France.
- Benz, N., Kerbiriou, M., Gillet, D., Trouvé, P., and Férec, C. (2010). Annexin A5 modulation expression by *gonadotropin-releasing-hormone* (GnRH) : conséquences on F508del-CFTR protein. **Rencontres de la Recherche en Santé dans le Grand-Ouest**. Nantes, France.
- Benz, N., Pennec, J.P., Gillet, D., Trouvé, P., and Férec, C. (2009). Increased F508del-CFTR chloride channel activity by *gonadotropin-releasing hormone*. **32th European Cystic Fibrosis Society Conference**. Brest, France.
→ Prix du Meilleur Poster, catégorie "CFTR – Cell Biology / Physiology"

MÉDIATISATION DES CONNAISSANCES

- *40 ans du Département Génie Biologique de l'IUT de Quimper*. (2012). Forum et tables rondes autour du thème : « Que faire après un DUT Génie Biologique ? », Poursuites d'études, Métiers. Quimper.
- *Conseil d'Administration de l'Association « GAÉTAN SALEÛN, DON DU SANG ET RECHERCHE EN GÉNÉTIQUE »*. (2011). Sensibilisation du public à la mucoviscidose et exposé des travaux effectués dans le cadre de mon projet de recherche. Brest.
- *Journée « Biodiversité Humaine »* organisée par Océanopolis. (2010). Sensibilisation du public (collégiens et lycéens) à la génétique et aux maladies génétiques. Brest.
- *Assemblée Générale de l'Association « GAÉTAN SALEÛN, DON DU SANG ET RECHERCHE EN GÉNÉTIQUE »*. (2009). Exposé des travaux effectués dans le cadre de mon projet de recherche et présentation des résultats préliminaires. Brest.

ENCADREMENT

- co-encadrement d'un étudiant en stage obligatoire de Master 2 (janvier-septembre 2013), intitulé du stage : « Mise au point et caractérisation de cultures de cellules épithéliales bronchiques et nasales humaine en vue de l'utilisation de la GnRH comme modulateur de l'activité du CFTR »
- Encadrement d'un étudiant en stage obligatoire de Master 1 (janvier-février 2012), intitulé du stage : « Mise en évidence de l'interaction et de la co-localisation des protéines CFTR et caluménine dans les cellules CFBE41o-wt et CFBE41o-/F508del »
- Encadrement d'un étudiant en stage obligatoire d'IUT 2^{ème} année (avril-juin 2011), intitulé du stage : « Modulation de l'expression de l'annexine A5 par la gonadolibérine dans les cellules épithéliales bronchiques humaines CF et non-CF »
- Encadrement d'un étudiant en stage obligatoire d'IUT 2^{ème} année (avril-juin 2010), intitulé du stage : « Mise en évidence de l'expression du récepteur à la *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) dans les cellules épithéliales bronchiques humaines CF et non-CF »

Introduction : La mucoviscidose est une maladie génétique autosomale récessive causée par des mutations dans le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Ce dernier code un canal chlorure AMPc-dépendant localisé dans la membrane apicale des cellules épithéliales, dont l'activité est régulée par de nombreuses interactions protéine-protéine. Dans le cadre de la recherche de nouveaux partenaires du CFTR, une interaction directe entre le canal (sauvage et muté F508del) et l'annexine A5 (AnxA5) a été mise en évidence dans notre laboratoire. Des stratégies de sur et de sous-expression nous ont également permis d'établir un lien fonctionnel entre les deux protéines. En effet, nos travaux montrent que les sécrétions ioniques dépendantes du CFTR sont corrélées au niveau d'expression intracellulaire de l'AnxA5. Par ailleurs, une élévation des courants médiés par le CFTR ainsi qu'une augmentation de la quantité de canaux dans la membrane plasmique sont observées suite à la surexpression de l'AnxA5 dans des cellules exprimant le CFTR muté F508del.

But de l'étude : Au vu de ces observations, l'AnxA5 apparaît comme une cible potentielle pour la correction de certains défauts engendrés par la mutation F508del. Une piste thérapeutique pourrait être l'identification de composés capables d'augmenter son expression dans des cellules épithéliales exprimant le mutant F508del de la protéine CFTR. Considérant les informations fournies par la littérature, notre choix s'est porté sur la GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*), molécule utilisée en thérapeutique humaine depuis plus de 25 ans. Ainsi, nous avons évalué l'effet de la GnRH sur la modulation de l'expression de l'AnxA5 et sur le transport ionique dépendant du CFTR dans nos différents modèles d'étude.

Résultats : Outre la présence du récepteur de la GnRH dans nos modèles cellulaires, nous montrons également que l'expression de l'AnxA5 y est augmentée dès 60 minutes de traitement avec l'hormone (1 nM). De plus, comparativement à des cellules non stimulées, des cellules prétraitées avec la GnRH présentent une hausse significative des sorties actives d'iodure, corrélant avec une augmentation de la quantité de CFTR à la surface cellulaire. Ces observations ont été faites dans les modèles exprimant le CFTR muté F508del ainsi que dans ceux exprimant le CFTR sauvage.

Conclusion : Dans nos modèles et selon nos conditions de stimulation, un traitement avec la GnRH augmente l'expression intracellulaire de l'AnxA5 et conduit à une élévation des sécrétions ioniques médiées par le canal CFTR. Néanmoins, au vu de la multitude de voies de signalisation susceptibles d'être activées et de gènes pouvant être régulés suite à la liaison de la GnRH sur son récepteur, l'effet observé sur l'AnxA5 ne représente probablement pas le seul événement cellulaire à l'origine de l'impact positif enregistré sur l'activité du canal CFTR.

Mots clés : CFTR, mutation F508del, transport ionique, AnxA5, GnRH, récepteur de la GnRH

Background : Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, which encodes a cAMP-stimulated chloride channel. CFTR is primarily located at the apical surface of epithelial cells, where its activity is regulated by some protein-protein interactions. As part of new CFTR's partners research, we previously showed that annexin A5 (AnxA5) binds directly to both normal and F508del-CFTR. Moreover, under and overexpression strategies led us to establish a functional link between these two proteins. In fact, CFTR-dependent ion secretions are correlated to the intracellular level of AnxA5. Otherwise, in transfected epithelial cells, AnxA5 overexpression increases CFTR's level in plasma membranes and raises CFTR-mediated currents in F508del-CFTR expressing cells.

Aim of the study : In the light of these findings, AnxA5 appears as a potential target in order to correct some defects caused by the F508del mutation. A therapeutic approach would be to find some compounds capable of increasing AnxA5 expression in F508del-CFTR expressing epithelial cells. Reviewing the literature, our choice fell on GnRH (gonadotropin-releasing hormone), a commonly used molecule for diverse clinical applications for 25 years. So, the effects of GnRH on the modulation of AnxA5 expression and on CFTR-dependent ion transport were assessed in our different cellular models.

Results : Beside the GnRH receptor expression, we show that AnxA5 expression is augmented in all cell lines after one hour incubation with the hormone (1 nM). Moreover, compared to untreated cells, a significant iodide efflux peak is measured in GnRH pretreated , which is correlated with an increased cell surface expression of CFTR. It is of interest to note that these observations have been made in CF and non-CF cells.

Conclusion : In our models and according to our stimulation conditions, GnRH treatment enhances AnxA5 intracellular expression and leads to a rise of CFTR-dependent ion secretions. Nevertheless, given the multitude of activated signaling pathways and regulated genes in response to GnRH binding to its receptor, the positive impact on CFTR activity is probably not solely explained by the effect on AnxA5 expression.

Keywords : CFTR, F508del mutation, ion transport, AnxA5, GnRH, GnRH receptor