



HAL
open science

Identification d'éléments régulateurs du gène CFTR et applications pour la mucoviscidose

Jennifer Bonini

► **To cite this version:**

Jennifer Bonini. Identification d'éléments régulateurs du gène CFTR et applications pour la mucoviscidose. Génétique humaine. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTT004 . tel-01344122

HAL Id: tel-01344122

<https://theses.hal.science/tel-01344122>

Submitted on 11 Jul 2016

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

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

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par UNIVERSITE MONTPELLIER

Préparée au sein de l'école doctorale CBS2

Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Et de l'unité de recherche UMR_S827 / EA7402

Laboratoire de génétique de maladies rares

Spécialité : Génétique Moléculaire

Présentée par Jennifer BONINI

**Identification d'éléments régulateurs du
gène *CFTR* et applications pour la
mucoviscidose**

Soutenu le 18 décembre 2015 devant le jury composé de

Pr. Mireille CLAUSTRES, PU-PH, Université de Montpellier	Président
Pr. Pascale FANEN, PU-PH, Université de Paris Est Créteil	Rapporteur
Dr. Jacky JACQUOT, CR1, Université de Reims	Rapporteur
Pr. Michel KOENIG, PU-PH, Université de Montpellier	Examineur
Dr. Aleksander EDELMAN, DR1, Université Paris-Descartes	Examineur
Dr. Magali TAULAN-CADARS, MCU, Université de Montpellier	Directeur de thèse



COORDONNÉES DU LABORATOIRE

La thèse présentée dans ce manuscrit a été réalisée au sein du Laboratoire de Génétique de Maladie Rares (LGMR) de Montpellier, sous la direction du docteur Magali TAULAN-CADARS.

Laboratoire de Génétique de Maladies Rares

IURC / UFR Médecine / Site Nord

640 av du doyen Gaston Giraud

34095 Montpellier Cedex 5

Tél. : 04 11 75 98 79

Fax : 04 11 75 98 82

Docteur Magali TAULAN-CADARS

magali.taulan@inserm.fr

Tél. : 04 11 75 98 64

RÉSUMÉ (Français)

Mots clefs : mucoviscidose, gène *CFTR*, facteurs de transcription et miARNs, épissage, oligonucléotides antisens.

Identification d'éléments régulateurs du gène *CFTR* et applications pour la mucoviscidose.

La mucoviscidose est la maladie génétique létale la plus fréquente dans les populations d'origine Caucasiennes et résulte de mutations du gène *CFTR*. Bien que de nombreux travaux aient permis de comprendre le mode de synthèse et de maturation de la protéine ainsi que la fonction du canal *CFTR*, les mécanismes qui contrôlent l'expression de ce gène restent peu connus. En effet, le gène *CFTR* est finement régulé au niveau tissulaire et au cours du développement pulmonaire. Le contrôle de cette expression nécessite le recrutement d'éléments régulateurs qui modulent à la fois l'activité de son promoteur et la stabilité de son transcrite en contexte physiologique et lors de stress cellulaires induits par la pathologie. Le premier travail a été d'identifier en contexte physiologique des régulateurs, incluant des facteurs de transcription et des miARNs, qui participent à la répression de l'expression du gène *CFTR* dans des cultures pulmonaires fœtales et matures. La détermination d'éléments *cis* répresseurs a permis le développement d'outils capables de stabiliser les transcrits *CFTR*. Grâce à l'utilisation d'oligonucléotides modifiés bloquant la fixation des miARNs sur le transcrite *CFTR*, nous avons montré dans un modèle *ex vivo* issu de patients CF, une augmentation du taux d'ARNm et de la quantité de protéines *CFTR* (p.Phe508del); ainsi qu'une restauration de l'activité du canal muté. Le second travail fait suite à l'exploration du locus *CFTR*, par des séquenceurs de deuxième génération, des régions non codantes incluant les introns, séquences encore peu étudiées à ce jour. Sur une cohorte de patients CF chez qui une seule mutation avait été identifiée, nous avons détecté de nouvelles mutations affectant l'épissage à travers l'insertion d'un exon cryptique. L'utilisation d'oligonucléotides modifiés, spécifiquement localisés sur les introns ciblés, a permis de restaurer la séquence normale des transcrits. Enfin, dans le but d'identifier de nouveaux miARNs qui participent à la physiopathologie CF, le profil d'expression des miARNs a été évalué à partir de différents épithéliums respiratoires (polypes, nez, bronches) issus d'individus sains où atteints de mucoviscidose. La caractérisation d'éléments *cis*- et *trans*-régulateurs est essentielle pour poursuivre la compréhension des mécanismes impliqués dans l'expression du gène *CFTR* ainsi que pour déterminer de nouvelles cibles pour combattre la mucoviscidose.

RÉSUMÉ (Anglais)

Key words: Cystic Fibrosis, *CFTR* gene, transcription factors and miRNAs, splicing, antisense oligonucleotides.

Identification of *CFTR* gene regulatory elements and applications for the Cystic Fibrosis.

Cystic Fibrosis is the most frequent lethal genetic disease in the Caucasian populations and results from *CFTR* gene mutations. Many studies improved the understanding of *CFTR* biogenesis and *CFTR* channel function, however the mechanisms driving the expression of this gene remains neglected. *CFTR* gene displays a tightly regulated tissue-specific and temporal expression in the lungs. This regulation requires the recruitment of regulatory elements which modulate the activity of *CFTR* gene transcription and the stability of its transcript, in both physiological and cellular stress conditions. Firstly, we identify regulators including transcription factors and miRNAs, which contribute to the *CFTR* gene repression in pulmonary mature cells compared to foetal cultures. Determination of *cis*-repressors elements led to the development of oligonucleotides that specifically block miRNAs binding on the *CFTR* transcripts and that stabilize it. Administration of these modified oligonucleotides in an *ex-vivo* model taken from CF patients, increased *CFTR* mRNA level, p.Phe508del proteins amount, as well as restored *CFTR* channel activity. Secondly, by using a next generation sequencing approach, we explored the entire *CFTR* locus, including introns poorly studied. In CF patients in whom only one mutation had hitherto been identified, we found the second disease-causing *CFTR* mutation that results in aberrantly spliced transcripts due to the inclusion of a pseudoexon in the mature transcripts. We next tested the effect of pseudoexon skipping mediated by antisense oligonucleotides targeting splice sites on two splicing mutations. Our findings result in the restoration of the full-length, in-frame *CFTR* transcript, demonstrating the effect of antisense oligonucleotide-induced pseudoexon skipping in CF. Finally, in order to identify new miRNAs deregulated in CF and to determine their involvement in CF physiopathology, miRNA expression profiling was carried out in three airway epitheliums (polyps, nose, bronchi) taken from healthy individuals and CF patients. Characterization of *cis*- and *trans*-regulatory elements offers new understanding of the control of the *CFTR* gene regulation and new therapeutic targets for Cystic Fibrosis.



*A MES GRANDS MÈRES MATHILDE & JOSETTE,
A CHRISTINE & LULU.*



REMERCIEMENTS

▣ Je remercie le Professeur Pascale FANEN et le Docteur Jacky JACQUOT, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, en tant que rapporteur. Je remercie également le Docteur Aleksander EDELMAN, le Professeur Michel KOENIG et le Professeur Mireille CLAUSTRES qui ont accepté, en faisant parti de ce jury, d'assister à la soutenance de cette thèse. C'est un honneur de vous présenter à tous le travail effectué durant ces trois années de doctorat.

Je souhaite tout particulièrement remercier le Professeur Mireille CLAUSTRES, dont l'investissement est total, autant pour les patients que pour le personnel du laboratoire. Merci de m'avoir accueillie, il y a trois ans, au sein du Laboratoire de Génétique de Maladies Rares. Merci également au Professeur Michel KOENIG qui a repris le flambeau. Travailler au laboratoire m'a offert la possibilité d'exercer ma passion au sein d'un groupe où le diagnostic clinique et la recherche interagissent. J'ai pu ainsi approfondir mes connaissances et effectuer des travaux capitaux pour mon parcours.

▣ Je tiens particulièrement à témoigner toute ma gratitude à ma directrice de thèse, le Docteur Magali TAULAN-CADARS. Merci de m'avoir accueillie dans ton équipe. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité, ta bonne humeur ainsi que ton investissement personnel. Il est agréable de travailler avec des personnes passionnées et motivées, prêtes à relever tous les défis. Merci également pour nos discussions scientifiques, dans lesquelles tu m'as laissé m'exprimer et partager mes idées. Merci pour tous les congrès auxquels tu m'as fait participer (ECFS Conference, ECFS Basic Science, ...), je t'en suis très reconnaissante. Merci également pour la qualité des compétences scientifiques que tu m'as apporté. Enfin, merci pour tes qualités humaines.

▣ Un grand merci également à l'association Vaincre La Mucoviscidose qui a financé mon travail durant ces trois années.

▣ Je tiens évidemment à remercier le Docteur Raphaël CHIRON du Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose du CHRU de Montpellier et les infirmières de son équipe, sans qui les études sur les épithéliums de cellules nasales n'auraient

pas été possibles. Merci Raphaël d'avoir toujours pris le temps de nous recevoir, même lorsque tu étais surchargé de travail. Ton aide tout au long de ma thèse a été très précieuse.

▣ Merci à toutes les personnes qui ont accepté de participer à mes comités de thèse : Professeur Arnaud BOURDIN, Docteur Christelle CORAUX, Docteur Hervé SEITZ et Docteur Brice MARCET. Merci aux collaborateurs de ce travail : Docteur Emmanuelle BROCHIERO, Docteur Olivier TABARY et Docteur Nicolas MOLINARI. Merci également à l'équipe Med Bio Med pour tous ces échanges durant les réunions "prix Nobel".

▣ Un grand merci aux personnes de l'équipe « Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du gène *CFTR* », au sein de laquelle j'ai réalisé ma thèse. Merci à Jessica (*Jess*) ma binôme, que de souvenirs avec toi et notre ami l'incubateur ! Une chose importante que nous avons appris ensemble en congrès, est que près d'un portillon automatique, se trouve souvent un interrupteur magique (référence bibliographique : Albufeira, Mars 2015). Alexandra (*Alex*), je te souhaite tout plein de bonnes choses pour ta thèse. Désolé, ton secret va être dévoilé : arrêtes les shoots d'éthanol quand tu astiques les hottes. Enfin merci Karine pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

▣ Petit clin d'œil au bureau des thésards : Merci Alessandro (*Aless, notre doctorant Italien*) pour nous avoir fait partager ta passion pour Amanda Lear "Rendez vous ...", grâce à toi son succès perpétue. Merci à Claire pour toutes ces conversations partagées et à Milena (*la reine du make-up*), qui m'a appris à bidouiller sur « R » et qui nous a fait à tous partager sa générosité Brésilienne.

▣ Je remercie également très chaleureusement toutes les personnes du laboratoire ainsi que toutes les personnes que j'ai croisé ici durant ma thèse (stagiaires ...). En particulier, merci à toutes les personnes du groupe Muco sans qui le papier séquençage n'aurait pas vu le jour. Je souhaite ajouter une pensée particulière pour Eva, notre ancienne post-doctorante Autrichienne, qui est l'une de mes plus belles rencontres amicales durant ce doctorat.

▣ Je remercie mes grands-parents qui ont toujours été là quand j'avais besoin d'eux et qui ont su être d'un soutien et d'un réconfort à toute épreuve. J'aimerais dire au monde entier, à quel point vous êtes merveilleuses mes mamies chéries. Merci également à mon père (*Papou*), mon frère (*Toto*), mon oncle Eric, ma tante Jacqueline (*Jacotte*), mes cousins adorés Dylan (*Didi*), Yohan (*Yoyo*) et Kevin (*Kéké*) ainsi que ma cousine Sarah. Merci aussi à Eric (*Eric Police ou la Bulle*) de m'avoir élevé comme ta propre fille jusqu'à mes 16 ans et d'avoir été derrière moi pour l'école : tu as toujours été très stricte mais aujourd'hui je t'en remercie. Je souhaite également ajouter une petite pensée pour ma sœur Morgane, mon neveu Ryan et mon frère Kevin que j'aime très fort.

▣ Merci à mes amis proches qui m'ont toujours encouragé. Christine (*Mamounette*), tu es la mère que je n'ai jamais eu : parfois on rencontre des personnes qui changent nos vies, tu as été cette personne pour moi. Tu es quelqu'un d'extraordinaire et je ne pourrai jamais assez te montrer tout le respect que j'ai pour toi. Lucia (*Lulu*) ma meilleure amie! Que de chemin parcouru pour toutes les deux depuis la classe de 6^{ème}. Malgré les nombreux kilomètres qui nous séparent, notre amitié est restée intacte. Tu es ma sœur de coeur. Merci également à mes amies : Alexandra (*Alex*), Elodie (*qui cherche toujours le requin de la grande Motte*) et Claudine (*Cloclo*). Vous m'avez appris que l'amitié est l'une des choses les plus merveilleuses au monde. Un grand merci aussi à ma pharmacienne préférée Agnès, qui a toujours été là pour moi. Une belle amitié est née entre nous. Comme promis, nous voyagerons ensemble après nos thèses respectives. Merci à ma petite Najla pour ta bonne humeur et nos rires. Sophie, je n'ai pas pu aller à ton mariage, mais promis ma belle nous rattrapons le temps perdu. Un grand Merci à mon ami Thibault (*Thi-thi*) qui m'a soutenu durant la fin de mon doctorat. Pour finir, j'aimerais avoir une pensée pour Kevin (*Bibi*), qui est parti trop tôt malheureusement, durant le début de ma thèse. Ces quelques lignes dans mon mémoire sont l'occasion de te rendre hommage. Le temps peut bien passer mais les souvenirs restent immortels.

- **Merci à tous** -

AVANT PROPOS

La mucoviscidose, la pathologie génétique récessive la plus fréquente dans les populations Caucasiennes, est due à l'absence ou le dysfonctionnement de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). Ce défaut a pour conséquence une déshydratation du mucus à la surface de l'épithélium respiratoire, entraînant ainsi des infections chroniques et une réponse exacerbée du système immunitaire. Cette glycoprotéine code un canal qui est essentiel pour le maintien de l'homéostasie cellulaire hydro-ionique, au niveau des cellules épithéliales des tissus de l'endoderme (poumons, pancréas). Il est estimé que seulement quelques copies de transcrits *CFTR* sont présentes dans les cellules épithéliales du tractus pulmonaire. Au contraire, dans le poumon fœtal, le gène *CFTR* est fortement exprimé. Ces données suggèrent que la transcription du gène et/ou la stabilité de ces transcrits sont finement contrôlés pour expliquer cette répression dans les poumons matures. Cependant les éléments régulateurs impliqués dans la modulation de son expression restent méconnus. Connaître les mécanismes de régulation du gène est essentiel pour développer de nouvelles thérapies et combattre la maladie. En effet, la mucoviscidose se caractérise par un spectre mutationnel très large avec plus de 2000 altérations moléculaires répertoriées. Différents travaux récents visent à développer de nouvelles thérapies pour corriger l'activité du canal et les défauts de conformation de la protéine, mais d'autres études semblent indispensables pour permettre l'expression d'une protéine en quantité suffisante.

Ce travail de thèse a pour objectif d'identifier des éléments *cis* et *trans* régulateurs du gène *CFTR* afin de mieux comprendre la régulation de ce gène, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour la mucoviscidose ainsi que de proposer de nouveaux outils pour corriger l'expression de ce gène.

Ce mémoire est organisé en trois grands volets :

▣ La première partie comporte une synthèse de la littérature permettant d'introduire la mucoviscidose, les pistes thérapeutiques pour la recherche d'un traitement curatif et la régulation du gène *CFTR*.

▣ La deuxième partie présente les travaux de recherche réalisés durant ma thèse. Le premier article intitulé "***Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for Cystic Fibrosis***" décrit la caractérisation de nouveaux éléments régulateurs localisés au niveau des régions promotrices et 3'UTR ainsi que l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour stabiliser le transcrit *CFTR* et restaurer une protéine CFTR fonctionnelle. Le second article intitulé "***Small-scale high-throughput sequencing-based identification of new therapeutic tools in Cystic Fibrosis***" décrit l'identification de mutations d'épissage situées dans les régions introniques, détectées par les techniques de séquençage de seconde génération, et l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour corriger l'épissage aberrant induit par la mutation. Enfin, une étude du profil des miARNs entre différents types de cultures issues d'épithéliums respiratoires, provenant d'individus sains (non-CF) et atteints de mucoviscidose (CF), est présentée. Une discussion propre à chaque partie fait suite à chaque article.

▣ La troisième partie est une discussion générale sur le travail présenté dans ce mémoire, abordant diverses perspectives.

▣ Une partie « Annexes » contenant un chapitre de livre auquel j'ai participé ("***Role of Non-coding RNAs in Cystic Fibrosis***"), est également présente. Cette partie résume également sous forme de tableaux les données de la littérature dans lesquelles les miARNs ont été décrits pour réguler les transcrits *CFTR*, ainsi que les travaux publiés montrant une dérégulation des miARNs dans les modèles CF.

SOMMAIRE

1. LA MUCOVISCIDOSE	21
1.1. LA PATHOLOGIE	22
1.1.1. INTRODUCTION	22
1.1.2. LA MUCOVISCIDOSE ET LES PATHOLOGIES ASSOCIEES	24
1.1.3. PRINCIPAUX SIGNES CLINIQUES LIES AUX ANOMALIES DU GENE <i>CFTR</i>	25
1.2. LE GENE <i>CFTR</i>	27
1.2.1. LA LOCALISATION DU GENE <i>CFTR</i>	27
1.2.2. LES MUTATIONS DU GENE <i>CFTR</i>	27
1.2.2.1. La répartition des altérations du gène <i>CFTR</i>	27
1.2.2.2. La classification moléculaire des mutations du gène <i>CFTR</i>	28
1.2.2.3. Les altérations moléculaires du gène <i>CFTR</i> et le phénotype clinique des patients	30
1.3. LA RELATION GENOTYPE-PHENOTYPE	31
1.3.1. GENERALITES SUR LES CORRELATIONS GENOTYPE-PHENOTYPE	31
1.3.2. LA PARTICIPATION DES ALLELES COMPLEXES DANS LA SEVERITE DE LA MALADIE	32
1.3.3. L'INFLUENCE DES GENES MODIFICATEURS DANS LE PHENOTYPE	33
1.4. LA PROTEINE <i>CFTR</i>	34
1.4.1. LA STRUCTURE DE LA PROTEINE <i>CFTR</i>	34
1.4.2. LA BIOGENESE DE LA PROTEINE <i>CFTR</i>	36
1.4.3. LA REGULATION DE L'OUVERTURE DU CANAL <i>CFTR</i>	38
1.4.4. LES FONCTIONS DU CANAL <i>CFTR</i>	39
1.5. LES THERAPIES ACTUELLES DANS LA MUCOVISCIDOSE	39
1.5.1. INTRODUCTION	39
1.5.2. L'HYDRATATION DU LIQUIDE DES VOIES AERIENNES	42
1.5.2.1. L'utilisation d'agents osmotiques	42
1.5.2.2. L'activation d'autres canaux chlorures	42
1.5.2.3. L'inhibition du canal ENaC	43
1.5.3. COMBATTRE L'INFECTION	43
1.5.4. LE DEVELOPPEMENT DES THERAPIES ANTI-INFLAMMATOIRES	44
1.5.5. CORRIGER LES DEFAUTS MOLECULAIRES RESULTANTS DES MUTATIONS DU GENE <i>CFTR</i>	45
1.5.5.1. Corriger la protéine <i>CFTR</i> mutée	45
1.5.5.2. Corriger le gène <i>CFTR</i> muté	47
1.5.5.3. Corriger l'ARNm <i>CFTR</i> muté	49
2. REGULATION DU GENE <i>CFTR</i>	52
2.1. L'EXPRESSION DU GENE <i>CFTR</i>	53
2.1.1. L'EXPRESSION TISSU SPECIFIQUE DU GENE <i>CFTR</i>	54
2.1.2. L'EXPRESSION DU GENE <i>CFTR</i> AU COURS DU DEVELOPPEMENT	57
2.2. LES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES DANS L'EXPRESSION DU GENE <i>CFTR</i>	59
2.2.1. LA METHYLATION DU PROMOTEUR <i>CFTR</i>	59
2.2.2. L'ACETYLTATION DES HISTONES DANS LA REGULATION DU PROMOTEUR <i>CFTR</i>	60
2.3. LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE <i>CFTR</i>	60
2.3.1. LES CARACTERISTIQUES DU PROMOTEUR <i>CFTR</i>	60

2.3.2.	LA REGULATION EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE	61
2.3.3.	LA REGULATION AU COURS D'UN STRESS CELLULAIRE	63
2.1.	L'ORGANISATION DE LA CHROMATINE	66
2.1.1.	LES SITES HYPERSENSIBLES A LA DNASE (DHS) ET LA FIXATION DES FACTEURS <i>TRANS</i>	66
2.1.1.1.	Introduction	66
2.1.1.2.	Les DHS dans la région promotrice	68
2.1.1.3.	Les DHS longues distances situés dans la région 5'	68
2.1.1.4.	Les DHS situés dans les introns	69
2.1.1.5.	Les DHS longues distances situés dans la région 3'	71
2.1.2.	L'ORGANISATION DES NUCLEOSOMES	71
2.1.3.	LES INTERACTIONS LONGUES DISTANCES DU GENE <i>CFTR</i>	73
2.2.	REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE <i>CFTR</i>	76
2.2.1.	L'ÉPISSAGE	76
2.2.1.1.	Le processus d'épissage	76
2.2.1.2.	Les exons alternatifs du transcrit <i>CFTR</i>	79
2.2.1.3.	Introduction aux défauts d'épissage	80
2.2.1.4.	Les défauts d'épissage du gène <i>CFTR</i>	82
2.2.2.	LA REGION 5'UTR DU TRANSCRIT <i>CFTR</i> ET LES UORF	85
2.2.1.	LA REGION 3'UTR DU TRANSCRIT <i>CFTR</i>	86
2.2.1.1.	Les miARNs	86
2.2.1.2.	Introduction aux motifs ARE et ARE-BPs	86
2.2.1.3.	Les éléments <i>cis</i> -régulateurs du gène <i>CFTR</i> de type ARE	87
2.2.1.4.	Impact de la délétion du triplet nucléotidique CTT dans la stabilité du transcrit <i>CFTR</i>	88
2.2.1.5.	Autres facteurs impactant la stabilité du transcrit <i>CFTR</i>	89
3.	MIARNs ET MUCOVISCIDOSE	90
3.1.	INTRODUCTION AUX MIARNs	91
3.1.1.	L'HISTORIQUE SUR LES MIARNs	92
3.1.2.	LA BIOGENESE ET LE MECANISME D'ACTION DES MIARNs	93
3.2.	LA REGULATION POST TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE <i>CFTR</i> PAR LES MIARNs	96
3.2.1.	L'ACTION DIRECTE DES MIARNs SUR LE TRANSCRIT <i>CFTR</i>	96
3.2.2.	L'ACTION INDIRECTE DES MIARNs SUR LE TRANSCRIT <i>CFTR</i>	98
3.1.	LES MIARNs DANS LA MUCOVISCIDOSE	98
3.1.1.	INTRODUCTION DES MIARNs DANS LES PATHOLOGIES	98
3.1.2.	LES MIARNs DEREGULES DANS LES MODELES CF EN COMPARAISON AVEC LES MODELES NON-CF	99
3.1.3.	LA DEREGULATION DES MIARNs DANS DES MECANISMES LIES A LA MUCOVISCIDOSE	103
3.1.4.	LES MIARNs : DE NOUVELLES CIBLES POUR CONTROLER L'EXPRESSION DES GENES.	104
3.1.4.1.	Introduction aux antimirs	104
3.1.4.2.	L'inhibition de l'action des miARNs agissant sur le transcrit <i>CFTR</i>	107
4.	RESULTATS	108
4.1.	ARTICLE 1 : TRANSCRIPTION FACTORS AND MIRNAS THAT REGULATE FETAL TO ADULT <i>CFTR</i> EXPRESSION CHANGE ARE NEW TARGETS FOR CYSTIC FIBROSIS	109
4.1.1.	CONTEXTE DE L'ETUDE	109
4.1.2.	PUBLICATION	110
4.1.3.	DISCUSSION DE L'ARTICLE	127
4.1.4.	AUTRES RESULTATS NON PUBLIÉS	133
4.2.	ARTICLE 2 : SMALL-SCALE HIGH THROUGHPUT SEQUENCING-BASED IDENTIFICATION OF NEW THERAPEUTIC TOOLS IN CYSTIC FIBROSIS	138

4.2.1.	CONTEXTE DE L'ETUDE	138
4.2.2.	PUBLICATION	139
4.2.3.	DISCUSSION	157
4.2.4.	AUTRES RESULTATS NON PUBLIES	161
4.3.	DEREGULATION DES MIARNs DANS LES MODELES ALI CF ET NON-CF	164
4.3.1.	INTRODUCTION	164
4.3.2.	MATERIEL ET METHODES	167
4.3.2.1.	Etudes fonctionnelles	167
4.3.2.2.	Etude du profil d'expression des miARNs	167
4.3.3.	RÉSULTATS	168
4.3.4.	DISCUSSION	191
5.	DISCUSSION GÉNÉRALE	194
6.	ANNEXES	201
6.1.	CHAPITRE « ROLE OF NON-CODING RNAs IN CYSTIC FIBROSIS »	202
6.2.	PROTEINES FONCTIONNELLES ET PHENOTYPE	230
6.3.	MIARNs AGISSANT SUR L'EXPRESSION DU GENE <i>CFTR</i>	231
6.4.	LES MIARNs DEREGULES CHEZ LES INDIVIDUS CF	236
7.	REFERENCES	247

TABLEAUX

Tableau 1 :	Altérations moléculaires du gène <i>CFTR</i> et phénotype clinique.....	31
Tableau 2 :	Les principaux DHS décrits dans le gène <i>CFTR</i>	67
Tableau 3 :	Description des substitutions identifiées dans les introns du gène <i>CFTR</i>	83
Tableau 4 :	Expression du gène <i>CFTR</i> chez les patients CF porteurs de la mutation p.Phe508del.	88
Tableau 5 :	Impact des facteurs sur la stabilité des transcrits <i>CFTR</i> dans différentes lignées cellulaires	89

FIGURES

Figure 1 : Incidence de la mucoviscidose en France.	23
Figure 2 : Mucoviscidose typique et atypique	22
Figure 3 : Répartition des altérations du gène <i>CFTR</i>	28
Figure 4 : Les différentes classes de mutations.	30
Figure 5 : Contribution des gènes modificateurs dans la variabilité des signes cliniques de la mucoviscidose.	33
Figure 6 : Du gène <i>CFTR</i> à la structure de la protéine CFTR.	35
Figure 7 : Biogenèse et maturation de la protéine CFTR.	37
Figure 8 : Mécanisme d'ouverture du canal CFTR.	38
Figure 9 : Traitements et essais cliniques en cours pour la mucoviscidose.	41
Figure 10 : Exemple d'applications des oligonucléotides antisens pour corriger l'épissage.	50
Figure 11 : Mucoviscidose et thérapies personnalisées.	51
Figure 12 : Expression du gène <i>CFTR</i> dans les différents tissus humains.	53
Figure 13 : L'épithélium respiratoire.	55
Figure 14 : Expression du gène <i>CFTR</i> dans les poumons au cours du développement.	58
Figure 15 : Principaux sites d'initiation de la transcription (TSS) décrits dans le promoteur <i>CFTR</i> humain.	61
Figure 16 : Régulation transcriptionnelle du gène <i>CFTR</i> en condition physiologique.	63
Figure 17 : Régulation transcriptionnelle du gène <i>CFTR</i> lors d'un stress cellulaire.	65
Figure 18 : Répartition des nucléosomes au niveau de la région promotrice du gène <i>CFTR</i>	72
Figure 19 : Interactions du gène <i>CFTR</i>	73
Figure 20 : Principaux facteurs décrits au niveau des DHS du gène <i>CFTR</i>	75
Figure 21 : Site d'épissage et séquences régulatrices.	77
Figure 22 : Mécanisme d'épissage	78
Figure 23 : Les différents défauts d'épissage	80
Figure 24 : Les mutations pouvant affecter le processus d'épissage.	81
Figure 25 : Site accepteur de type NANAG dans l'exon 15 du gène <i>CFTR</i>	84
Figure 26 : Principaux mécanismes d'action des uORFs.	85

Figure 27 : Localisation des miARNs.....	91
Figure 28 : Mécanismes de régulation de la biogenèse des miARNs dans le noyau.....	94
Figure 29 : Mécanisme de régulation des miARNs : du précurseur au miARN mature.....	95
Figure 30 : Les miARNs qui se fixent sur la région 3'UTR <i>CFTR</i>	97
Figure 31 : MiARNs dérégulés dans les pathologies respiratoires.	99
Figure 32 : Dérégulation des miARNs impactant l'expression du transcrit <i>CFTR</i>	100
Figure 33 : MiARNs dérégulés dans les modèles CF impliqués dans l'inflammation.....	101
Figure 34 : Rôle de miR-93 dans les cellules bronchiques CF infectées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
Figure 35 : Chimie des antimiRs couramment utilisés	105

ABRÉVIATIONS

2'F : 2'-fluoro

2'O-Me : 2'O-methyl

2'O-MOE : 2'O-methoxyethyl

3C : Chromosome Conformation Capture

A

ABC : ATP Binding Cassette

ABCD : Agénésie Bilatérale des Canaux Déférents

ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AGO : Argonaute

ALI : Air Liquid Interface

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

ANO1 : Octamine 1

AONs : Antisens oligonucleotides

AP-1 : Activator-Protein 1

AP-2 : Activator-Protein 2

ARE : Adenine Uridine-rich elements

ARE-BP : ARE-Binding protein

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASL : Airway Surface Liquid

ASZ1 : Ankyrin repeat, SAM and basic leucine Zipper domain containing 1

ATF : Activating Transcription Factor

ATP : Adénosine triphosphate

B

Bach1 : BTB and CNC homology 1

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

C

C/EBP : CCAAT Enhancer Binding Protein

CBP : CREB-Binding protein

CDP/cut : CCAAT Displacement protein/cut

CDX2 : Caudal-type homeobox 2

CERES : Composite Exonic Regulatory Element of Splicing

CF : Cystic Fibrosis (*mucoviscidose*)

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CFTR-RD : CFTR-Related Diseases

CHD6 : Chromatin Helicase DNA-binding 6

ChIP : Chromatin immunoprecipitation

CHIP : C-terminus of Hsc70 Interacting Protein

CoCl₂ : Chlorure de cobalt

CRCM : Centre de Ressource et de Compétences de la Mucoviscidose

CREB : cAMP Response Element Binding

CSDC2 : Cold Shock Domain Containing Protein C2

CTCF : CCCTC-binding factor

CTSS : Cathépsine S

CTTNBP2 : Cortactin Binding Protein 2

CVF : Capacité Vitale Forcée

D

DCTN4 : Dynactin

DGCR8 : DiGeorge Critical Region 8

DHS : DNase I Hypersensitive Sites

DO : Decoy Oligonucleotides

DMOG : Dimethyloxalyglycine

E

ECL : Extracellular Loop

ENaC : Epithelial Na⁺ Channels

ERAD : ER-associated degradation

ESE : Exon Splicing Enhancer

ESS : Exon Splicing Silencer

F

FDA : US Food and Drug Administration

FDR : False Discovery Rate

FRT : Fischer Rat Thyroid

FOX : Forkhead box

FT : Facteur de Transcription

G

GRE : Glucocorticoid Receptor Element

GSNO : S-nitrosoglutathion

H

HAS : Haute Autorité de Sante

HAT : Histone Acétyl Transférase

HDAC : Histone Désacétylase

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HGVS : Human Genome Variation Society

HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor-1

HNF1 : Hepatocyte Nuclear Factor-1

HRE : Hypoxia-Inducible Factor 1

HTA : Hypertension Artérielle

I

ICL : Intracellular loop

Il : Interleukine

IRD1 : Immune Response Deficient 1

ISE : Intron Splicing Enhancer

ISPE : Intron-Splicing Processing Element

ISS : Intron Splicing Silencer

K

KRT18 : Keratin 18

L

LCR : Locus Control Region

LLC : Leucémies Lymphoïdes Chroniques

LNA : Locked Nucleic Acid

LPS : Lipopolysaccharide

LR-PCR : Long-Range PCR

M

MafK : v-Maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K

MBBO : MiRNA-Binding Blocker Oligonucleotides

miARN : microARN

MSD : Membrane-Spanning Domain

N

NBD : Nucleotide Binding Domain

NFR : Nucleosome Free Region

NKX2.1 : NK2 homeobox 1

NMD : Nonsense-Mediated Decay

NO : Monoxyde d'azote

Nrf2 : Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2

O

ORF : Open Reading Frame

ORCC : Outwardly Rectifying Cl⁻ Channels

P

PAO : Pseudomonas aeruginosa

P Bodies : Processing bodies

PCAF : p300/CREB-binding protein Associated Factor

PCE : Polypyrimidine-rich Controlling Element

PDHX : Pyruvate dehydrogenase complex, component X

PI : Pancreatic insufficiency

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PMA : Phorbol Myristate Acetate

PNA : Peptide Nucleic Acid

PPP2R1A : Protein phosphatase 2 regulatory subunit A

PPP2R4 : Protein phosphatase 2A activator regulatory subunit 4

Pré-miR : Précurseur de microARN

Pri-miR : miARN primaire

PS : Pancreatic Sufficiency

PTC : Premature Termination Codon

Q

q-PCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

R

RARS : Arginyl-tRNA synthetase

RE : Réticulum Endoplasmique

RIIID : RNase III Domains

RIP : RNA Immunoprecipitation

RISC : RNA-Induced Silencing Complex

ROMK : Renal Outer Medullary K⁺ channels

RPM : Reads Per Millions

S

siRNA : Short Interfering RNA

SF1 : Splicing Factor 1

SHIP-1 : Inositol polyphosphate-5-phosphatase

SNAP23 : Synaptosomal-associated protein

SP1 : Specificity Protein 1

Sp3 : Specificity protein 3

STX1A : Syntaxin 1A

T

TALEN : Trans Activator Like Effector Nucleases

TAP-Tar : Tandem Affinity Purification of miRNA Target mRNAs

TCF4 : T Cell Factor 4

TLDA : TaqMan Low Density Array

TMD : TransMembrane Domain

TNF : Tumor Necrosis Factor

TOM 1 : Target of Myb protein 1

TRBP : TAR RNA-Binding Protein 2

TSA : Trichostatine A

TSB : Target Site Blocker

TSS : Transcription Start Site

TTP : Tristetraprolin

U

U- snRNPs : Uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particles

U2AF1 : U2 small nuclear RNA Auxiliary Factor 1

uORF : upstream Open Reading Frame

UPR : Unfolded Response Protein

UTP : Uridine triphosphate

UTR : Untranslated region

V

VEMS : Volume Expiratoire Maximal en 1 seconde

W

WT : Wild Type

Y

YAC : Yeast Artificial Chromosome

YY1 : Yin Yang 1

Z

ZFN : Zinc Finger Nucleases

1. LA MUCOVISCIDOSE

1.1. La pathologie

1.1.1. Introduction

La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive létale la plus fréquente dans les populations Caucasiennes. Elle résulte de mutations du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) qui permet l'expression de la protéine CFTR, un canal à ions chlorures (Cl⁻) (Anderson *et al.* 1991) présent au pôle apical des cellules épithéliales de l'organisme (glandes sudoripares, arbre trachéobronchique, canaux pancréatiques et biliaires, tubes séminifères). La prévalence de cette pathologie est estimée à environ 1 cas sur 4700 naissances en France (Farrell 2008a). De plus, il existe une variabilité selon l'origine ethnique (**figure 1**) et des différences géographiques sont observées avec une incidence élevée en Bretagne, en Normandie, en Lorraine, en Franche-Comté et dans les Bouches du Rhône (Audrézet *et al.* 2014).

La fonction la plus décrite de la protéine CFTR est la régulation des flux hydro-électrolytiques transmembranaires responsables de la qualité des sécrétions exocrines. Ainsi, lorsque cette protéine n'est pas fonctionnelle ou est absente, une sueur salée et des sécrétions muqueuses visqueuses sont observées chez les patients mucoviscidosiques (CF). Ce sont notamment ces sécrétions anormales au niveau des voies respiratoires qui entraînent des infections et une inflammation chronique, responsables à long terme de la destruction du parenchyme pulmonaire puis du décès des patients, en l'absence d'une transplantation bi-pulmonaire. La mucoviscidose est une maladie qui se caractérise également par une atteinte du système reproducteur et gastro-intestinal (De Boeck *et al.* 2006; Farrell *et al.* 2008b). Son nom en anglais « **Cyctic Fibrosis** » signifie d'ailleurs fibrose kystique en référence au pancréas.

En 1938, le Dr Anderson fut la première personne à distinguer la mucoviscidose des maladies cœliaques, en observant la présence d'une accumulation de mucus à l'intérieur des conduits glandulaires, chez des nourrissons souffrant de malnutrition. En 1948, la vague de chaleur qui frappa New York, a permis au Dr Paul di Sant'Agnese de découvrir que de nombreux enfants souffrant d'insolation étaient atteints de cette même pathologie. Il démontra quelques années plus tard en 1953, que la sueur de ces enfants était caractérisée par un excès de sodium et de chlore. Cette découverte majeure a permis dès 1959 d'utiliser le test de la sueur comme test de diagnostic pour la mucoviscidose (pour revue Davis 2006).

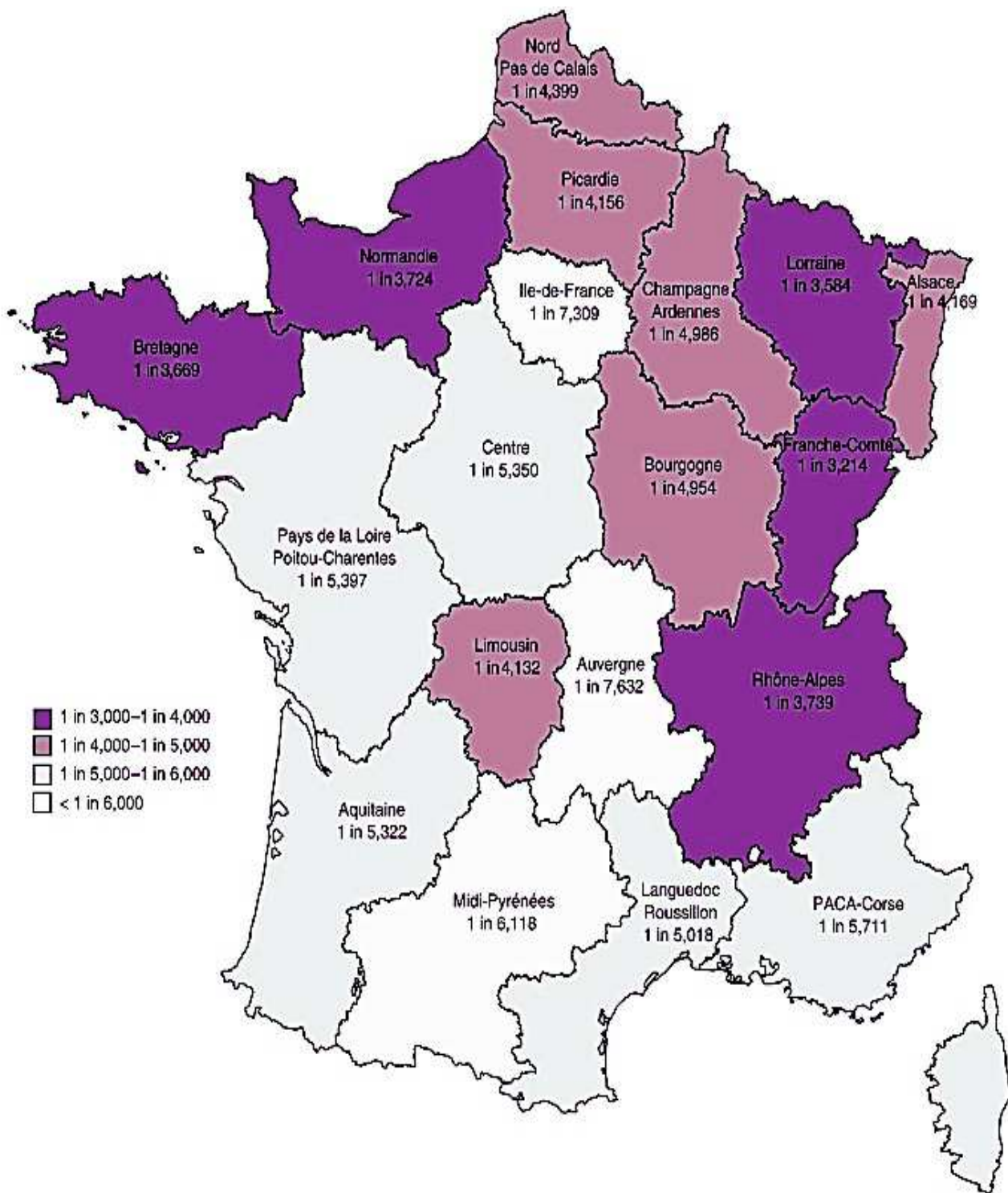


Figure 1: Incidence de la mucoviscidose en France.
(D'après Audrézet *at al.* 2014)

1.1.2. La mucoviscidose et les pathologies associées

La mucoviscidose sous sa forme la plus classique, se caractérise par une atteinte sévère multifonctionnelle des organes dérivés de l'endoderme recouverts d'un épithélium glandulaire. Cette pathologie présente une grande hétérogénéité clinique avec des formes plus modérées, souvent monosymptomatiques : les formes atypiques ou CFTR-RD (Related Diseases) incluant les patients atteints d'agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD), de bronchectasies ou de pancréatites. En France, le dépistage néonatal est obligatoire depuis 2002. La combinaison des résultats du test de la sueur, des signes cliniques et de la génétique participent au diagnostic (Haute autorité de santé 2009, pour revue : Fanen *et al.* 2014).

La mucoviscidose typique. Sont inclus dans cette catégorie les patients qui présentent les caractéristiques suivantes : un test à la sueur positif ($>$ à 60 mmol/L), une ou plusieurs manifestations cliniques de la mucoviscidose et une mutation délétère du gène *CFTR* sur chaque allèle (**figure 2**).

Les pathologies associées au dysfonctionnement de la protéine CFTR (CFTR-RD). Sont inclus dans cette catégorie les patients qui présentent les caractéristiques suivantes : un test à la sueur normal ($<$ à 30 mmol/L) ou intermédiaire (30-60 mmol/L), au moins une caractéristique phénotypique de la mucoviscidose, une mutation du gène *CFTR* sur chaque allèle ou un défaut d'activité de la protéine CFTR mis en évidence par une différence de potentiel nasal élevée (**figure 2**).

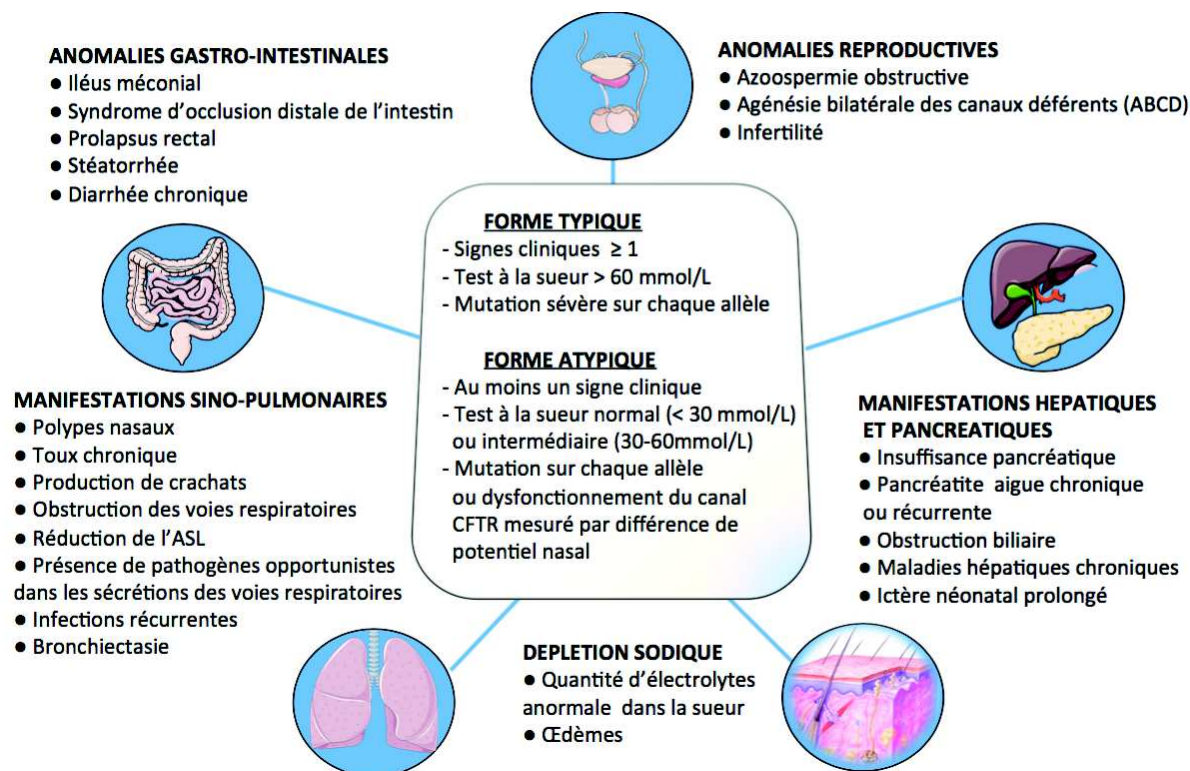


Figure 2 : Mucoviscidose typique et atypique.
(Adapté de Fanen *et al.* 2014)

1.1.3. Principaux signes cliniques liés aux anomalies du gène *CFTR*

La mucoviscidose est une maladie polyviscérale qui présente une diversité de signes cliniques.

Atteintes digestives et troubles nutritionnels. Au niveau du système gastro-intestinal, la mucoviscidose entraîne des maladies hépatiques telles que des cirrhoses biliaires focales ou multi-lobulaires, des ictères néonataux prolongés (jaunisses), des calculs vésiculaires (cholélithiases) sans désordres hémolytiques, des cholangites sclérosantes primitives (diminution de la taille des canaux hépatiques), des obstructions biliaires, des pancréatites aiguës chroniques ou récurrentes et des insuffisances pancréatiques exocrines. L'hyperviscosité des sécrétions au niveau du pancréas perturbe la libération des enzymes digestives et entraîne des défauts de malabsorption (carence en vitamines liposolubles, hypoprotéïnémie) ainsi que des retards de croissance staturo-pondéraux. Cette pathologie se caractérise également par la présence d'une quantité anormale de graisses dans les selles

(stéatorrhée), des diarrhées chroniques, du diabète, des anomalies de fixation du rectum (prolapsus rectal) ainsi que des syndromes d'occlusion distale de l'intestin. La présence d'un iléus méconial est également décrite chez le nourrisson (De Boeck 2006, Farrell *et al.* 2008b; pour revue : Fanen *et al.* 2014, Cutting 2014, Amaral 2015).

Anomalies de l'appareil reproducteur. Chez les individus de sexe masculin, la mucoviscidose entraîne des problèmes d'infertilité liés à une azoospermie obstructive résultant de l'absence des canaux déférents (De Boeck 2006, Farrell *et al.* 2008b). Chez les individus de sexe féminin, l'hyperviscosité de la glaire cervicale participerait à une diminution de la fertilité (Kreda *et al.* 2012).

Syndrome de déplétion sodique. La pathologie entraîne des pertes de sodium et des alcaloses métaboliques chroniques (Farrell *et al.* 2008b; pour revue Amaral 2015).

Atteintes osseuses et déformations. Chez les patients CF, une diminution de la densité osseuse (ostéopénie) ainsi que la présence d'ostéoporose a été observée (De Boeck 2006, Javier & Jacquot 2011). Un hippocratisme digital est également décrit (Farrell *et al.* 2008b).

Atteintes respiratoires. Les manifestations sino-pulmonaires se caractérisent par la présence de polypes nasaux, de pansinusites, de toux chroniques, d'exacerbations, d'obstruction des voies respiratoires, d'une réduction du liquide de surface des voies aériennes, d'infections récurrentes liées à la présence de pathogènes opportunistes tels que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Burkholderia cepacia* et de bronchiectasies (De Boeck 2006, Farrell *et al.* 2008b; pour revue Fanen *et al.* 2014, Amaral 2015).

Le Volume Expiratoire Maximal en 1 seconde (VEMS) et la Capacité Vitale Forcée (CVF) sont des paramètres pris en compte par les cliniciens pour évaluer la fonction respiratoire (Thumerelle 2003).

1.2. Le gène CFTR

1.2.1. La localisation du gène CFTR

Bien que la mucoviscidose ait été décrite pour la première fois en 1938 (Davis 2006), ce n'est qu'en 1989 que le gène *CFTR* a été identifié par des techniques de clonages positionnels (Riordan *et al.* 1989). Ce gène est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31.2), entre les gènes *ASZ1* (*ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain containing 1*) et *CTTNBP2* (*cortactin binding protein 2*). Il est composé de 27 exons et s'étend sur 189kb. Le transcrit *CFTR* quant à lui s'étend sur 6,5kb incluant les extrémités 5' et 3' non codantes.

1.2.2. Les mutations du gène CFTR

1.2.2.1. La répartition des altérations du gène CFTR

A ce jour, plus de 2 000 altérations moléculaires sont référencées sur le gène *CFTR* (base de données internationales genet.sickkids). Ces variations sont souvent rares ou privées et la majorité (40%) correspond à des faux-sens (**figure 3**). Environ 16% représentent des décalages du cadre de lecture résultant de petites insertions/délétions et 11% des altérations décrites affectent le processus d'épissage. Il est également décrit la présence d'insertions/délétions qui ne modifient pas le cadre de lecture. Parmi cette catégorie se retrouve la mutation p.Phe508del présente chez 67% des allèles CF en France (Audrézet *et al.* 2014). Cette mutation correspond à la délétion d'un triplet nucléotidique CTT situé dans l'exon 11 et entraîne l'absence d'une phénylalanine située en position 508 de la protéine.

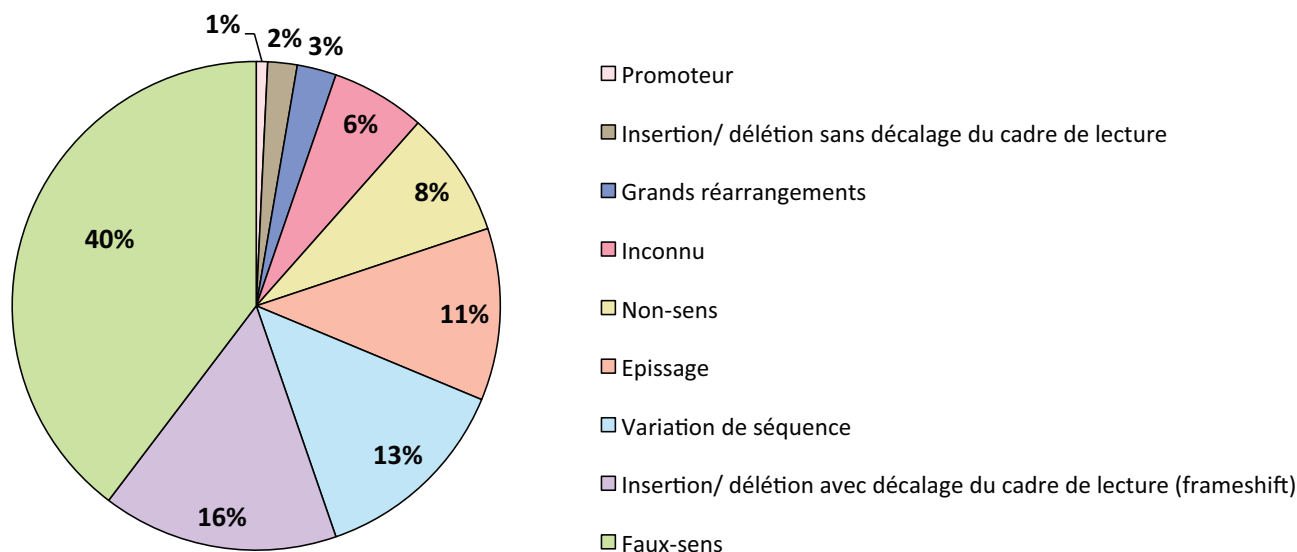


Figure 3 : Répartition des altérations du gène *CFTR*.
(Adapté de la base de données genet.sickkids)

1.2.2.2. La classification moléculaire des mutations du gène *CFTR*

Les mutations du gène *CFTR* sont classées en 6 catégories en fonction de leur conséquence moléculaire (Pour revue : Boyle & De Boeck 2013, Amaral 2015).

Classe I : Absence de synthèse protéique. Dans cette catégorie se retrouvent des mutations non-sens (p.Gly542*, G542X), des insertions/ délétions et des mutations d'épissage qui entraînent la présence d'un codon stop prématuré (PTC). Il en résulte la présence d'un transcrit et/ou d'une protéine tronquée, instable et rapidement dégradée. Les ARN porteurs d'un PTC peuvent être pris en charge par le NMD (Nonsense-Mediated Decay), un système de contrôle des ARNs présent chez les mammifères. À cette catégorie s'ajoutent également les délétions totales ou partielles du gène *CFTR* ainsi que les réarrangements altérant les séquences exoniques.

Classe II : Défaut de maturation de la protéine CFTR. Dans cette catégorie se retrouvent les mutations entraînant un défaut de repliement de la protéine. C'est le cas de la mutation p.Phe508del (F508del) où les protéines mal repliées sont retenues dans le réticulum endoplasmique puis sont dégradées dans le cytoplasme par le système protéasome.

Classe III : Défaut d'activation du canal. Il s'agit le plus souvent de mutations faux-sens situées dans les domaines de liaison à l'ATP (domaines NBD1 et NBD2) qui régulent l'ouverture du canal. C'est le cas de la mutation p.Gly551Asp (G551D) présente à la membrane plasmique mais non fonctionnelle.

Classe IV : Défaut de conductance du canal. Il s'agit le plus souvent de mutations faux-sens situées dans les domaines transmembranaires formant le pore du canal, ce qui a pour conséquence une diminution du flux d'ions et une sélectivité modifiée. C'est le cas de la mutation p.Arg117his (R117H).

Classe V : Diminution de la synthèse protéique. Dans cette catégorie se retrouvent des mutations du promoteur qui diminuent la transcription du gène *CFTR* (Taulan *et al.* 2007) et des mutations d'épissage qui permettent de produire à la fois un transcrit sauvage et aberrant. C'est le cas de la séquence poly (T) située dans l'intron 9 qui entraîne le saut de l'exon 10. Environ 90% de transcrits sauvages sont retrouvés avec les allèles T₇ et T₉ tandis que l'allèle T₅ permet de produire seulement 10 à 40% de transcrits correctement épissés (Chu *et al.* 1993).

Classe VI : Défaut de stabilité de la protéine mature. Dans cette catégorie sont incluses des mutations qui permettent la synthèse de protéines fonctionnelles mais qui sont très vite dégradées par la machinerie cellulaire. C'est le cas des mutations p.Cys1400X, p.Gln1412X, p.Ile1383AsnfsX3 (Boyle & De Boeck 2013).

Ces catégories (**figure 4**) soulignent l'importance de définir le type de mutations et leurs conséquences moléculaires afin de proposer une thérapie adaptée à chaque patient.

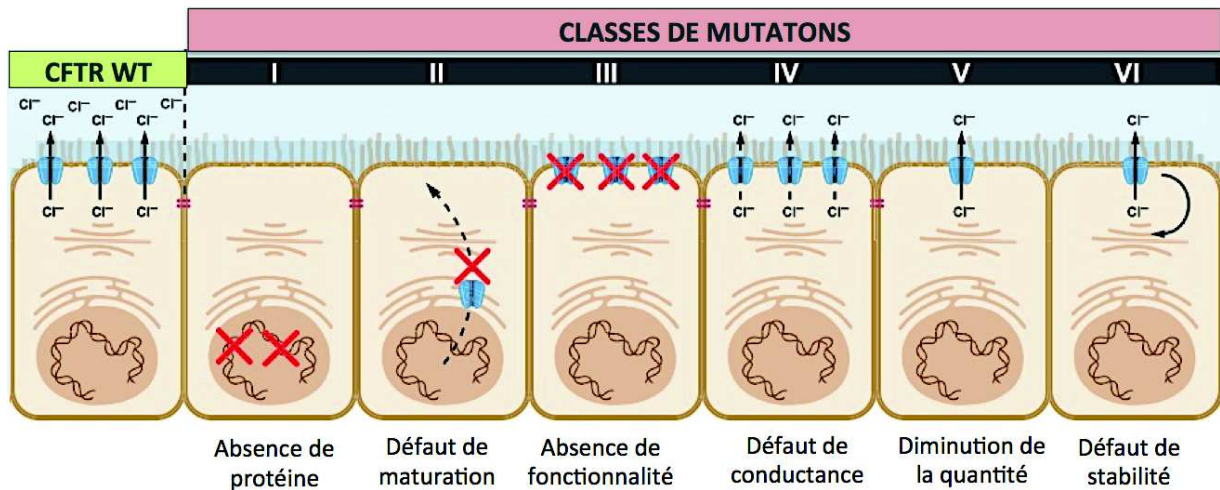


Figure 4 : Les différentes classes de mutations.
(Adapté d'Amaral 2015)

1.2.2.3. Les altérations moléculaires du gène *CFTR* et le phénotype clinique des patients

Les altérations moléculaires peuvent également être regroupées (**tableau 1**) en fonction du phénotype clinique des patients (Castellani *et al.* 2008, pour revue : Fanen *et al.* 2014).

Groupe A : Les altérations moléculaires responsables des formes typiques de la mucoviscidose. Toutes les mutations sévères (classe I, II et III) appartiennent à ce groupe. Exemples : *p.Phe508del (F508del)*, *p.Gly551Asp (G551D)*, *p.Gly542* (G542X)*, *p.Arg117his (R117H)*

Groupe B : Les altérations moléculaires retrouvées dans les pathologies associées au gène *CFTR* (atrésies bilatérales des canaux déférents, bronchiectasies, polyposes nasales majeures et pancréatites). Exemple : *p.Leu997Phe (L997F)*

Groupe C : Les altérations moléculaires n'entraînant pas de symptômes cliniques. Exemple : *p.Phe508Cys (F508C)*

Groupe D : Les altérations moléculaires dont la pathogénicité n'est pas clairement définie. Il s'agit principalement des mutations faux-sens dont l'impact fonctionnel n'est pas encore établi.

Cependant, certaines mutations peuvent se retrouver dans plusieurs groupes, montrant ainsi l'importance du contexte génétique de chaque patient.

	Exemple de mutations
Groupe A	F508del, R553X, R1162X, R1158X, 2184delA, 2184insA, 3120+1G>A, I507del, 1677delTA, G542X, G551D, W1282X, N1303K, 621+1G>T, 1717-1G>A, A455E, R560T, G85E, R334W, R347P, 711+1G>T, 711+3A>G*, 1898+1G>A, S549N, 3849+10kbC>T, E822X, 1078delT, 2789+5G>A, 3659delC, R117H-T5 (*), R117H-T7 (*), D1152H (*), L206W (*), TG13-T5 (*)
Groupe B	R117H-T7(*), TG12-T5(*), R117H-T5 (*), D1152H (*), TG13-T5 (*), S997F, R297Q*, L997F, M952I, D565G*, G576A*, TG11-T5**, R668C-G576A-D443Y, R74W-D1270N
Groupe C	I148T, R75Q, 875+40A/G, M470V, E528E, T854T, P1290P, 2752-15G/C, I807M, I521F, F508C, I506V, TG11-T5**
Groupe D	Principalement des mutations faux sens

* Mutations pouvant appartenir au groupe A et B

** Mutations pouvant appartenir au groupe B et C

Tableau 1 : Altérations moléculaires du gène *CFTR* et phénotype clinique.
(Adapté de Castellani *et al.* 2008)

1.3. La relation génotype-phénotype

1.3.1. Généralités sur les corrélations génotype-phénotype

Une grande variabilité phénotypique est observée chez les patients CF et actuellement il est difficile d'établir une relation génotype-phénotype, exceptée pour la fonction pancréatique où la corrélation est plus claire (Rowntree & Harris 2003, Corvol *et al.* 2006, Cutting 2014). Les patients qui souffrent d'insuffisance pancréatique (PI) sont homozygotes ou hétérozygotes composites pour deux mutations sévères (classe I, classe II et classe III) tandis que les patients avec une suffisance pancréatique (PS) sont porteurs d'au moins une mutation modérée (classe IV). De plus, les mutations p.Arg117His (R117H), p.Arg334Trp (R334W) et p.Arg.34Pro (R347P) sont souvent associées à des atteintes pancréatiques moins sévères (Rowntree & Harris 2003).

1.3.2. La participation des allèles complexes dans la sévérité de la maladie

La présence de multiples variations sur le même allèle participe à la diversité phénotypique. Le premier allèle complexe a été décrit en 1991 chez un patient hétérozygote composite porteur de la mutation p.Arg553* (R553X) et de la mutation p.Arg553Gln (R553Q) *en cis* de la mutation p.Phe508del. Ce patient présentait un test de la sueur limite comparé aux individus homozygotes p.Phe508del et hétérozygotes p.Phe508del/ p.Arg553*, suggérant une modulation de la sévérité du phénotype par la présence de l'allèle complexe (Dörk *et al.* 1991). Au contraire, deux mutations *cis* peuvent également aggraver un phénotype. Les mutations p.Arg347His et p.Asp979Arg seules sont retrouvées chez des phénotypes modérés tandis que l'allèle complexe [p.Arg347His ; p.Asp979Arg] (R347H-D99A) associé à la mutation p.Phe508del est responsable d'un phénotype sévère (Clain *et al.* 2001). De plus, l'effet d'une mutation peut être modulé par la présence d'un variant situé dans les régions régulatrices du gène *CFTR*. C'est le cas du variant -102T>A situé dans le promoteur et associé à la mutation sévère p.Ser549Arg (S549R, classe III) (Romey *et al.* 1999). Tous les patients homozygotes pour cet allèle présentent une forme modérée de mucoviscidose. Des études fonctionnelles ont mis en évidence que ce variant active la transcription du gène *CFTR*, ce qui compense l'effet délétère de la mutation exonique (Romey *et al.* 2000).

D'autres part, il a également été rapporté que le nombre de polyT situé dans l'intron 9 participe à la sévérité du phénotype, notamment lorsque ces répétitions sont associées à la mutation p.Arg117His (R117H), une mutation de classe IV (Sheppard *et al.* 1993). Les individus porteurs d'une mutation sévère et de l'allèle c.[350G>A; 1210-12T[5]] (R117H, T₅) présentent un phénotype CF-PS, contrairement aux individus porteurs de l'allèle c.[350G>A; 1210-12T[7]] (R117H, T₇) qui n'ont pas toujours d'atteintes pancréatiques et peuvent avoir uniquement une ABCD ou être asymptomatiques. Ces observations s'expliquent par le fait que la proportion d'ARNm *CFTR* sauvage est diminuée par l'allèle portant la mutation T₅, ce qui réduit davantage la quantité de protéines mutées finale à la membrane (Kiesewetter *et al.* 1993).

1.3.3. L'influence des gènes modificateurs dans le phénotype

Divers arguments ont mis en évidence la présence de mutations sur d'autres gènes que le gène *CFTR* dans la mucoviscidose (**figure 5**).

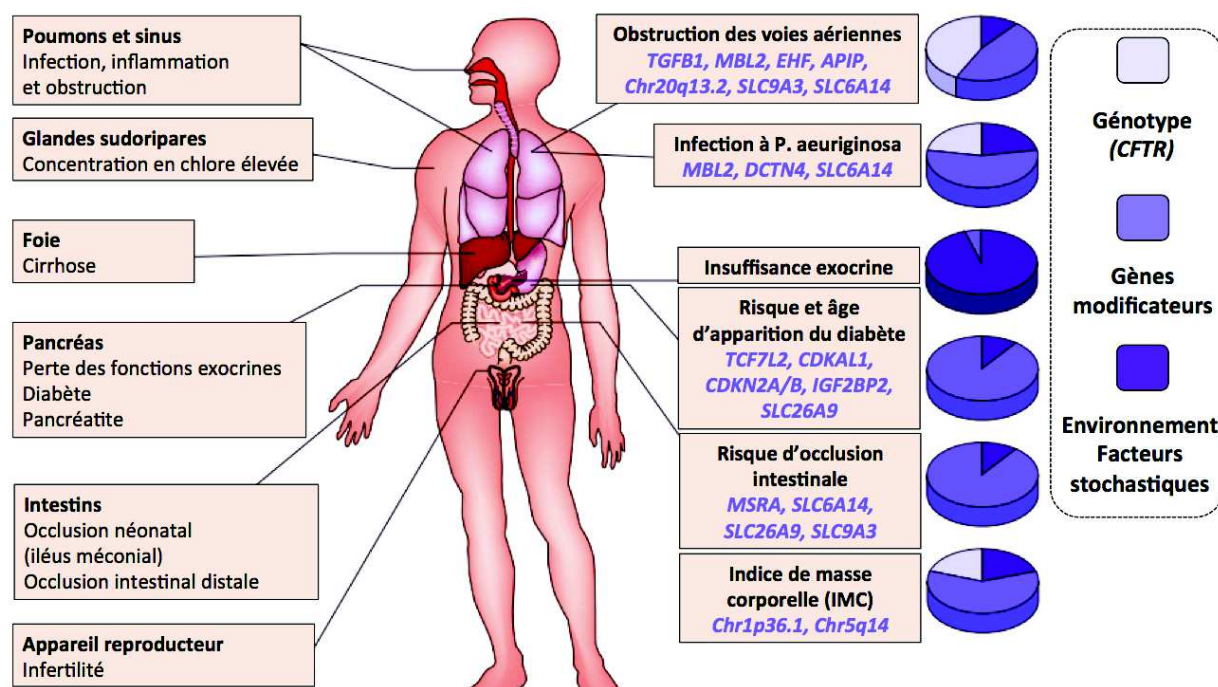


Figure 5 : Contribution des gènes modificateurs dans la variabilité des signes cliniques de la mucoviscidose.

(Adapté de Cutting 2014)

Les gènes modificateurs peuvent participer à la modulation de l'atteinte des voies respiratoires (obstruction et risque d'infection à *P. aeruginosa*), favoriser les risques de diabète et d'occlusion intestinale et impacter sur le statut nutritionnel.

La recherche de gènes modificateurs a été menée selon deux approches, celle dite « à priori » et celle dans des gènes candidats. Ces gènes modificateurs peuvent être impliqués dans la réponse inflammatoire (*TGFB1, IL-8, TNF, EDNRA*), la réponse infectieuse (*TLR4/TLR5, MBL2*), la lésion et la réparation cellulaire (*GSTs, NOS1/NOS3*), la réponse pharmacogénétique (*GR, β 2AR*), le transport ionique (*SLC9A3, ABCC1*) ou encore le cytosquelette (*KRT8*). Certains de ces gènes appartiennent à l'interactome de *CFTR* (*PPP2R4, SNAP23, STX1A*) (pour revue : Corvol *et al.* 2006, Guillot *et al.* 2014, Gallati 2014). De plus, des études pangénomiques ont permis de mettre en évidence l'implication du gène *IFRD1* (Gu

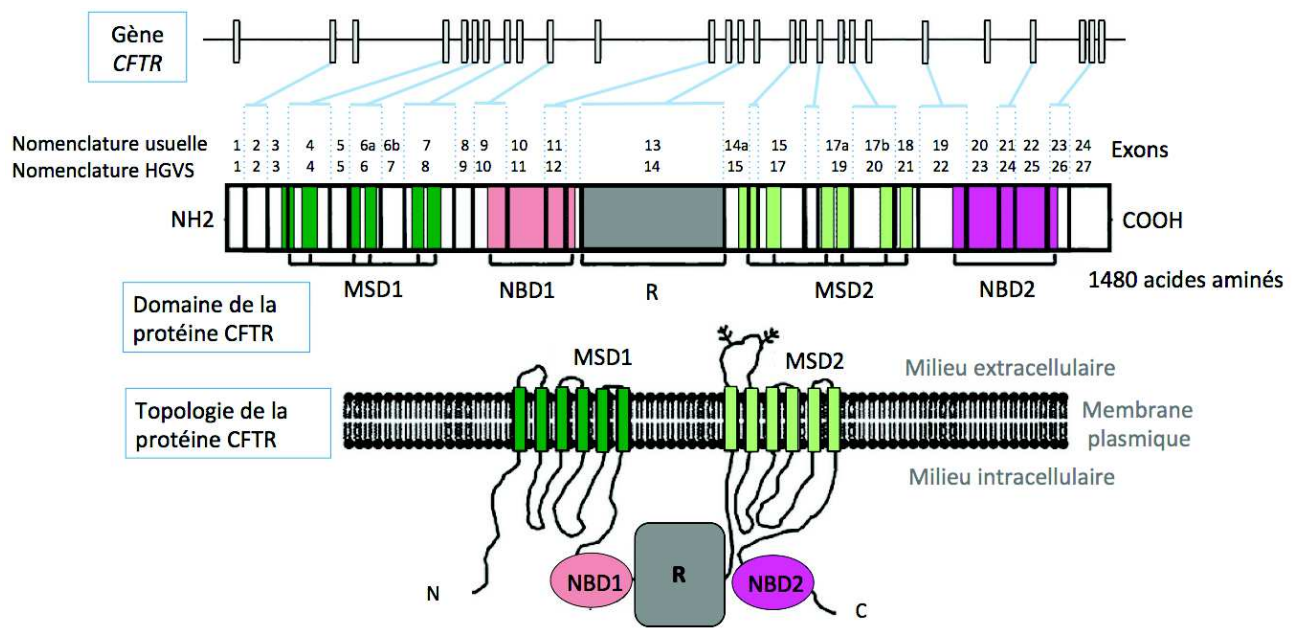
et al. 2009), de la région chr11p13 comportant les gènes EHF et APIP et de la région chr20q13.2 (Wright *et al.* 2011) dans l'atteinte pulmonaire. Bien que la mucoviscidose soit une maladie monogénique, l'utilisation de technologies de séquençage de nouvelles générations devraient fournir des informations précieuses sur l'implication de ces gènes dans la progression de la maladie. Il faut également tenir compte, au-delà des gènes de prédisposition, de l'impact de l'environnement (modifications épigénétiques) pour expliquer l'hétérogénéité clinique que peuvent présenter les patients porteurs du même génotype.

1.4. La protéine CFTR

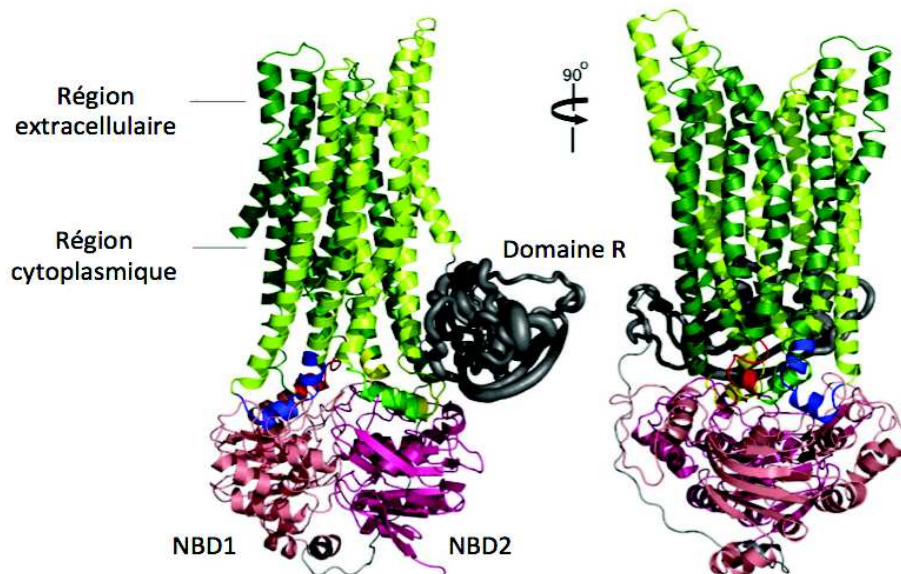
1.4.1. La structure de la protéine CFTR

La protéine CFTR (ABCC7) est un transporteur ABC (ATP Binding Cassette) (Hyde *et al.* 1990). Cette glycoprotéine de 1480 acides aminés est formée de deux motifs contenant chacun 6 domaines transmembranaires en hélice α (*TMD : TransMembrane Domain* ou *MSD : Membrane-Spanning Domain*) reliés entre eux par des boucles intra- et extracellulaires (*ICL : intracellular loop*, *ECL : extracellular loop*). Cette glycoprotéine comporte également deux domaines de fixation à l'ATP (*NBD : Nucleotide Binding Domain*) reliés par un domaine régulateur (domaine R) cytoplasmique (**Figure 6**). Ce dernier riche en sérine est la cible de phosphorylation par les protéines kinase A et C (PKA et PKC) (Riordan *et al.* 1989, Sheppard & Welsh 1999).

A



B



C

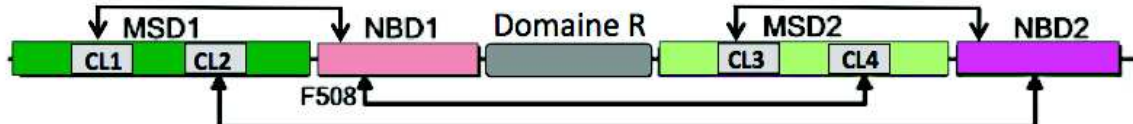


Figure 6 : Du gène *CFTR* à la structure de la protéine CFTR.
 (Adapté de Nissim-Rafinia *et al.* 2006 et Serohijos *et al.* 2008)

Le gène *CFTR* et la topologie de la protéine CFTR (Figure 6-A), la structure 3D (Figure 6-B) et les interactions entre les différents domaines protéiques de la protéine CFTR (Figure 6-C).

1.4.2. La biogenèse de la protéine CFTR

La synthèse de la protéine CFTR est initiée par l'action des ribosomes cytosoliques et s'achève au niveau du réticulum endoplasmique (RE) où cette protéine est maturée grâce à un repliement co-translationnel (Kim & Skach 2012). Cette biogenèse nécessite plusieurs étapes ainsi que la présence de protéines chaperonnes (pour revue : Pranke & Sermet-Gaudelus 2014). Le déroulement de ces différentes étapes est très organisé selon l'ordre suivant:

- Positionnement du domaine MSD1 dans la membrane du RE.
- Synthèse du domaine NBD1: ce domaine est stabilisé par les protéines chaperonnes Hdj2 (Hsp40) et Hsc70 (Hsp70).
- Synthèse du domaine R: ce domaine interagit avec la région N-terminale synthétisée.
- Synthèse du domaine MSD2 : cette étape permet la stabilisation des interactions NBD1/ domaine R.
- Formation du complexe MSD1/MSD2 : cette étape favorise également la stabilisation des domaines NBD1 et R, et nécessite la présence de la calnexine.
- Synthèse de NBD2.
- Etape de repliement post-translationnel. La présence des protéines chaperonnes cytosoliques dont Hsp90 est nécessaire pour finaliser la maturation de la protéine (Barriere & Lukacs 2006).

De plus, les protéines Hsc70 et Hsp90 participent également à la dégradation des protéines CFTR sauvages ou mutées mal repliées en favorisant le recrutement de la protéine CHIP (C-terminus of Hsc70 Interacting Protein) impliquée dans les mécanismes d'ubiquitination (Barriere & Lukacs 2006).

La protéine correctement repliée dans le RE est une protéine core ou monoglycosylée d'environ 145 kDa (forme B). Selon la littérature, environ 70% de la forme B est séquestrée et dégradée par la voie du protéasome. En effet, il est estimé que seulement 20 à 40% de protéines CFTR outrepassent le mécanisme de l'ERAD (ER-associated degradation) (Cheng *et al.* 1990, Lukacs *et al.* 1994, Ward & Kopito 1994; pour revue : Barriere & Lukacs 2006, Pranke & Sermet-Gaudelus 2014). Les peptides non dégradés migrent ensuite dans l'appareil de Golgi pour être maturés par glycosylation et former une protéine mature : la forme C

d'environ 170kDa. Il semblerait néanmoins que ces données soient dépendantes du type cellulaire. En effet, une étude a montré que dans les cellules qui expriment de manière endogène le gène *CFTR* (Calu-3, T84), la totalité de la protéine CFTR est maturée (forme C). Au contraire, dans des modèles de surexpression (COS-7, Hela), la maturation n'est que d'environ 30 et 40% respectivement (Varga *et al.* 2004). La glycoprotéine est ensuite adressée à la membrane plasmique où elle acquiert sa fonction de canal à ions chlorures avant d'être endocytée pour être recyclée ou dégradée par le lysosome (**figure 7**) (pour revue : Pranke & Sermet-Gaudelus 2014).

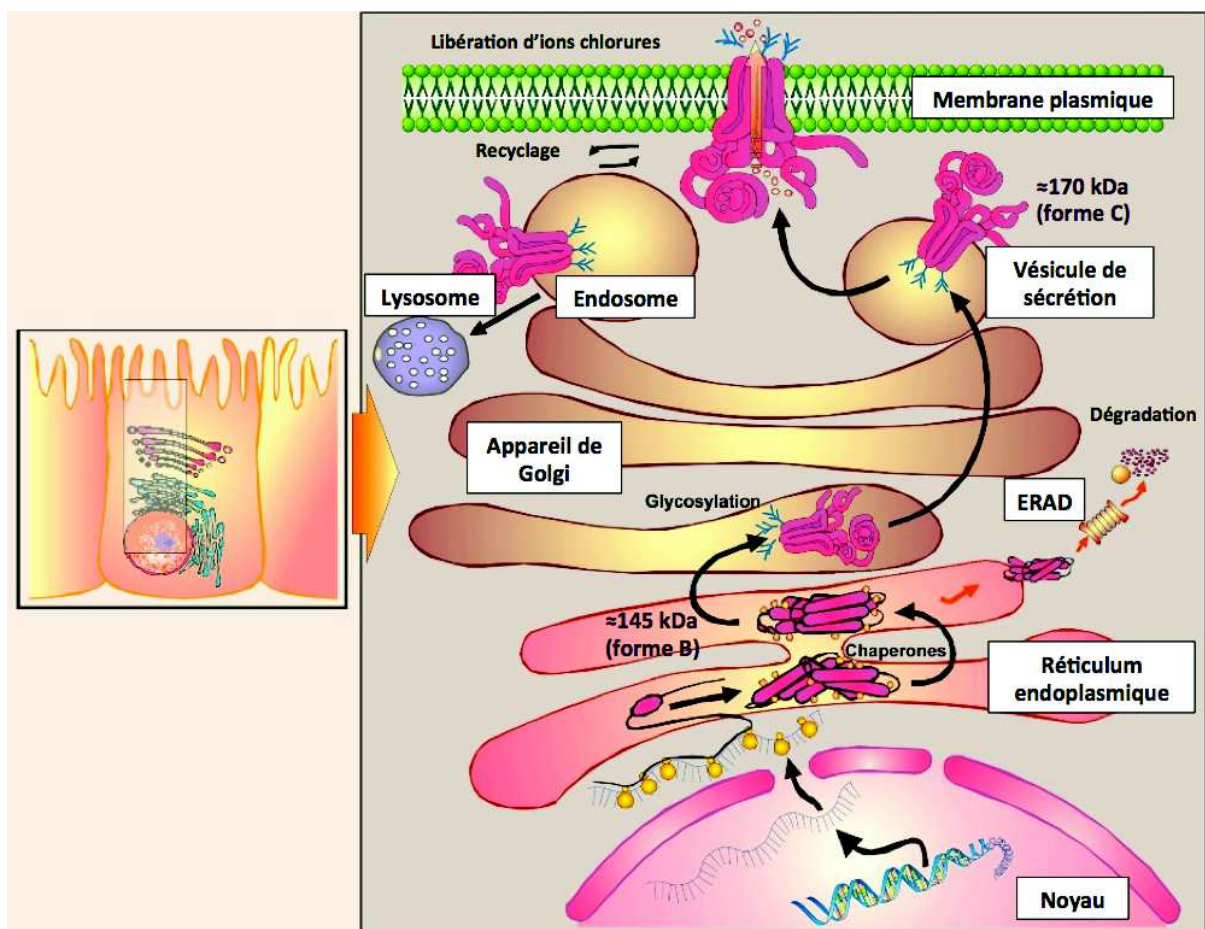


Figure 7 : Biogenèse et maturation de la protéine CFTR.
(Adapté de Pranke & Sermet-Gaudelus 2014)

Certains travaux ont mis en évidence qu'une petite proportion de protéines mal conformées peut atteindre la membrane et être fonctionnelle. C'est le cas de la protéine mutante p.Phe508del (Drumm *et al.* 1991, Dalemans *et al.* 1991, Sermet-Gaudelus *et al.* 2002). Cependant, l'accumulation de cette protéine mutante entraînerait un stress du réticulum

et activerait la réponse UPR (Kerbiou *et al.* 2007, Bartoszewski *et al.* 2008a). Ces données sont issues principalement de travaux réalisés après surexpression de la protéine CFTR.

1.4.3. La régulation de l'ouverture du canal CFTR

Une augmentation intracellulaire d'AMPc active les protéines kinases (PKA et PKC) qui phosphorylent le domaine R riche en sérine. Deux molécules d'ATP se fixent ensuite sur le domaine NBD1 puis NBD2, entraînant ainsi la dimérisation de ces deux régions cytoplasmiques. Un signal est ensuite émis à la région transmembranaire, ce qui permet l'ouverture du canal. Lorsque la molécule d'ATP située dans le domaine NBD2 est hydrolysée, les deux domaines NBD n'interagissent plus ensemble et le canal se ferme (Gadsby *et al.* 2006) (**figure 8**). Ainsi contrairement aux autres transporteurs ABC, le canal CFTR n'utilise pas l'ATP comme source d'énergie pour le transport de molécules mais pour son changement de conformation (Dean *et al.* 2001).

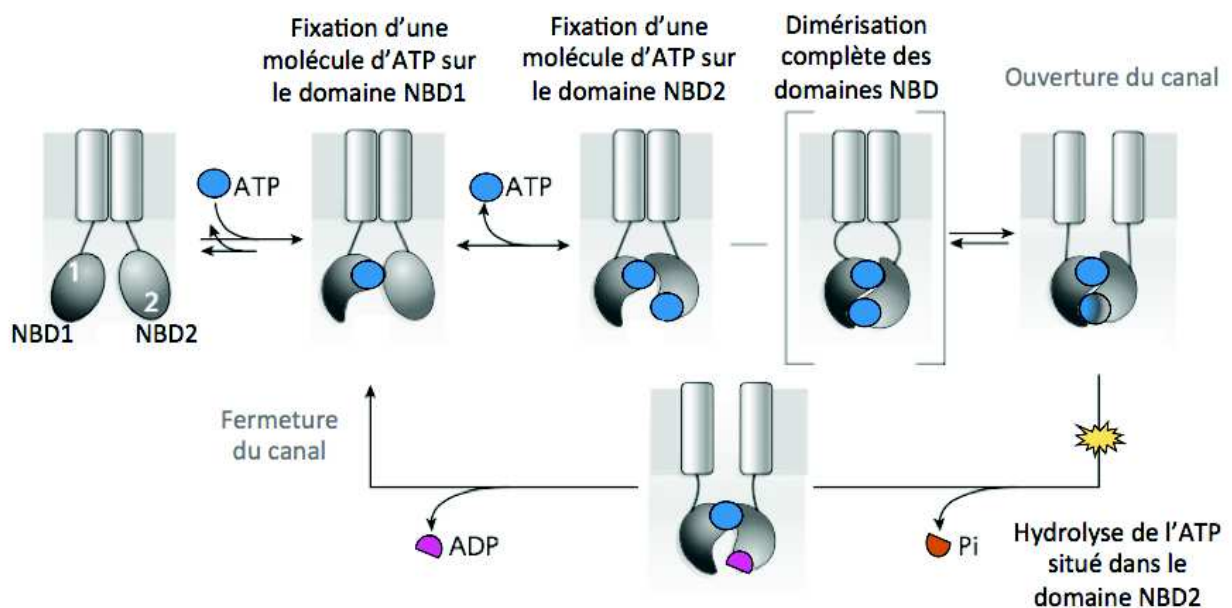


Figure 8 : Mécanisme d'ouverture du canal CFTR.
(Adapté de Gadsby *et al.* 2006)

Le Domaine R préalablement phosphorylé n'est pas représenté sur ce schéma.

1.4.4. Les fonctions du canal CFTR

La principale fonction de cette glycoprotéine présente au pôle apical des cellules épithéliales, est le transport des ions chlorures du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Au niveau des glandes sudoripares, le canal CFTR permet la réabsorption de ces mêmes ions (Rowe *et al.* 2005), ce qui explique la présence d'une concentration d'ions chlorures élevée dans la sueur des patients atteints de mucoviscidose.

De plus, ce canal est également permissif aux ions bicarbonates (HCO_3^-) et aux petits anions iodures (I⁻), bromures (Br⁻) et fluorures (F⁻) (Anderson *et al.* 1991) et permet la libération des molécules d'ATP (Reisin *et al.* 1994). Grâce à sa perméabilité au glutathion, la protéine CFTR joue également un rôle protecteur contre les radicaux libres (Linsdell & Hanrahan 1998). Diverses autres fonctions de cette protéine ont été décrites, en particulier dans la régulation d'autres canaux tels que le canal potassique ROMK (Renal Outer Medullary K⁺ channels), le canal à chlorure ORCC (Outwardly Rectifying Cl⁻ Channels) et le canal sodique ENaC (Epithelial Na⁺ channels) (Gabriel *et al.* 1993, Stutts *et al.* 1995, Schwiebert *et al.* 1999).

1.5. Les thérapies actuelles dans la mucoviscidose

1.5.1. Introduction

L'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose est passée de 5 ans dans les années soixante à 47 ans en moyenne (Haute autorité de santé 2009). Actuellement, ces patients sont pris en charge au sein de CRCM (Centre de Ressource et de Compétences de la Mucoviscidose) et encadrés par des équipes multidisciplinaires, ce qui a permis une amélioration considérable de la qualité et de l'espérance de vie. A l'heure actuelle, les principaux traitements sont symptomatiques (kinésithérapie de drainage, prise de bronchodilatateurs, inhalation d'antibiotiques) et permettent une amélioration de la fonction respiratoire. La prise d'enzymes pancréatiques et de compléments alimentaires permet également une amélioration des symptômes nutritionnels. Malgré ces avancées considérables, aucune thérapeutique n'empêche la destruction du parenchyme pulmonaire et la seule alternative reste la transplantation bi-pulmonaire (Durupt *et al.* 2014). Afin de trouver un

traitement efficace contre la mucoviscidose, le travail des équipes de recherche se porte principalement sur quatre grands aspects :

- *La physiologie* de l'épithélium respiratoire afin de moduler d'autres mécanismes cellulaires pour hydrater le mucus visqueux qui obstrue les bronches.

- *La microbiologie* afin d'éliminer les pathogènes opportunistes responsables des infections.

- *L'immunologie* afin de comprendre les mécanismes de défense de l'hôte et contrôler une inflammation trop sévère qui entraîne la dégradation du parenchyme pulmonaire.

- *La biologie moléculaire* pour corriger le gène *CFTR* et/ou les conséquences liées à ses mutations.

Ainsi, multiplier les modèles d'études ainsi que les axes de recherches fondamentaux permet l'émergence de nouvelles pistes thérapeutiques. Dans ce paragraphe sera présentée une vision succincte des différentes pistes thérapeutiques existantes. Les différents essais cliniques en cours sont représentés sur la **figure 9**.

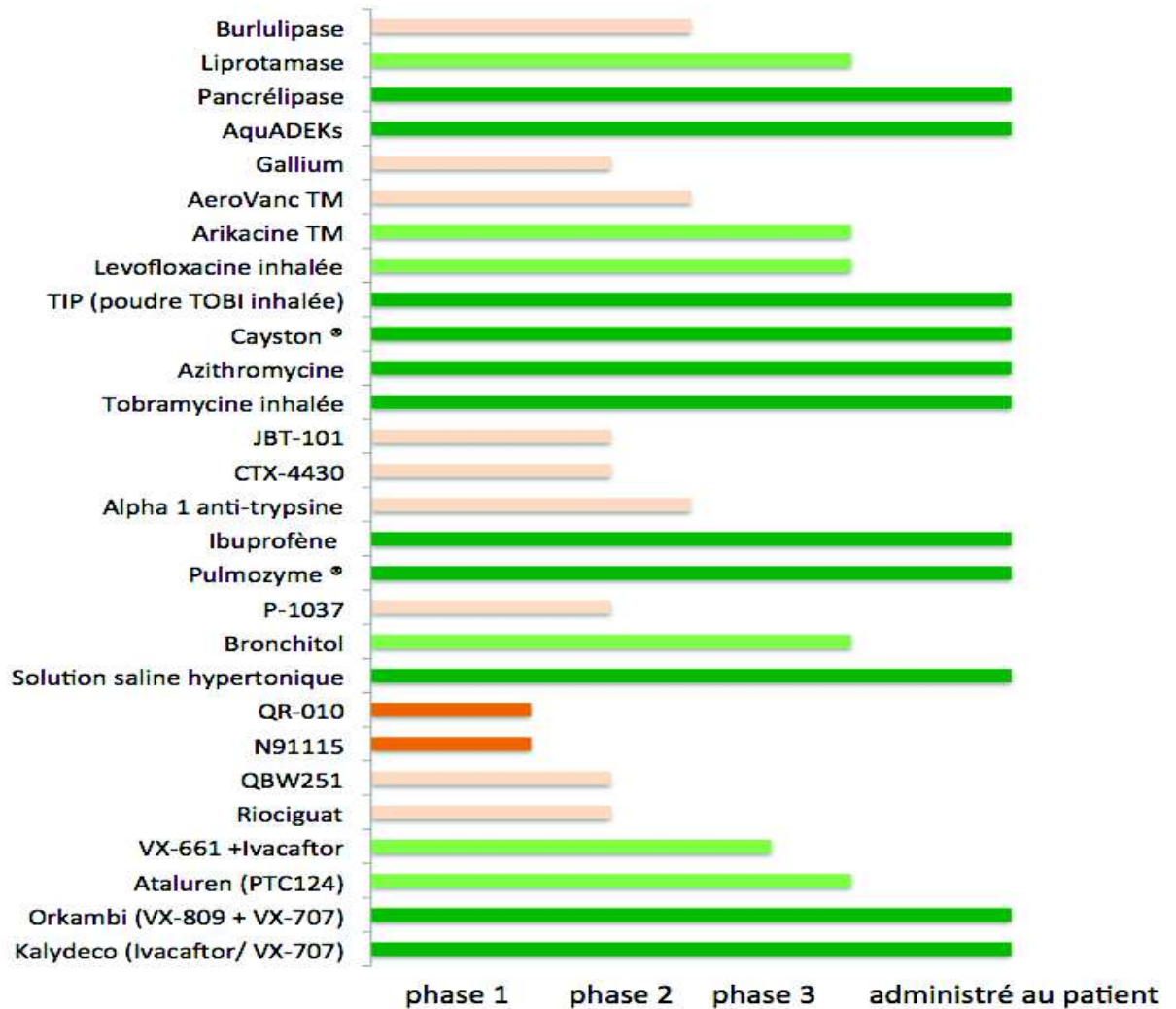


Figure 9 : Traitements et essais cliniques en cours pour la mucoviscidose.
 (Source : Cystic Fibrosis Foundation, octobre 2015)

Potentiateurs : Kalydeco, QBW251; **Combinaisons potentiateur + correcteur :** Orkambi, VX-661+ Ivacaftor; **Molécules de translecture des codons stop :** Ataluren; **Récepteurs de NO :** Riociguat; **Composés augmentant le taux de GSNO :** N91115; **Oligonucléotides correcteurs :** QR-010; **Agents osmotiques :** solution saline hypertonique, Bronchitol; **Bloqueurs du ENaC :** P-1037; **DNases :** Pulmozyme; **Anti-inflammatoires :** Ibuprofène, Alpha 1 anti-trypsin, CTX-4430, JBT-101; **Antibiotiques :** Tobramycine inhalée, Azithromycine, Causton, TIP (poudre TOBI inhalée), Levofloxacin inhalée, Arikace, AeroVanc; **Molécules anti-infectieuses :** Gallium; **Vitamines :** AquaADEKs; **Enzymes de remplacement :** Pancrélipase, Liprotamase, Burlulipase.

1.5.2. L'hydratation du liquide des voies aériennes

1.5.2.1. **L'utilisation d'agents osmotiques**

L'absence ou le dysfonctionnement du canal CFTR au pôle apical des cellules épithéliales respiratoires entraîne une réabsorption de l'eau et des ions sodiques. L'objectif des agents osmotiques est de réhydrater le liquide périciliaire en créant un gradient d'eau véhiculé à travers les aquaporines, du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Dans cet objectif, des solutions hypertoniques salines (NaCl) peuvent être utilisées (Clunes & Boucher 2008, Tildy & Rogers 2015). La présence d'une solution concentrée en sel à la surface de l'épithélium respiratoire, va permettre une sortie d'eau, du compartiment le moins concentré en ions vers le compartiment le plus concentré. La mannitol (bronchitol) est également utilisé, bien que le mécanisme d'action exact ne soit pas encore établi (Durupt *et al.* 2014, Clunes & Boucher 2008, Tildy & Rogers 2015). Le mannitol inhalé modifie les propriétés viscoélastiques du mucus, augmente l'hydratation de la couche périciliaire ainsi que la clairance mucociliaire (Haute autorité de santé 2012a).

1.5.2.2. **L'activation d'autres canaux chlorures**

Réactiver des canaux chlorures calcium dépendants tel que le canal THEM16A (*ou ANO1 pour octamine-1*) présent à la surface des cellules caliciformes est une piste envisagée (Mall & Galiotta 2015). Certaines molécules qui augmentent la concentration du calcium intracellulaire (ex : Moli-1901) ou des analogues de l'UTP qui activent les récepteurs P2Y₂ (ex : Denufusol) ont été testés (Ratjen *et al.* 2012, Tildy & Rogers 2015). D'autres pistes thérapeutiques ciblent des canaux à ions chlorures non calcium dépendants tel que le canal SLC26A9. Pour cela, des modulateurs du trafic intracellulaire qui permettent d'augmenter le nombre de ces canaux à la membrane ainsi que des molécules qui activent l'ouverture de ces canaux, peuvent être utilisés (Mall & Galiotta 2015).

1.5.2.3. L'inhibition du canal ENaC

Diverses molécules tels que des inhibiteurs de protéases (inhibition de l'activation protéolytique du canal) et des bloqueurs (inhibition de l'ouverture du canal) sont développées (Mall & Galiotta 2015). Actuellement, le bloqueur P-1037 est en cours d'essai clinique de phase II (Sources : ClinicalTrials.gov et Cystic fibrosis Foundation).

1.5.3. Combattre l'infection

L'hyperviscosité du mucus a pour conséquence une diminution de l'élimination des pathogènes par les battements ciliaires des voies respiratoires. Les pathogènes restent alors piégés dans les sécrétions, un microenvironnement propice à leur développement. L'épithélium devient alors le siège d'infections et d'inflammations. Parmi les agents infectieux, sont retrouvés des bactéries (*Pseudomonas aeruginosa* (PAO), *Staphylococcus aureus*...), des champignons (*Aspergillus fumigatus* ...) mais également des virus (*Influenza virus*...) (Kamath *et al.* 2015). La plupart des infections à PAO sont persistantes et deviennent chroniques chez les patients CF. Cette bactérie colonise d'abord les sinus paranasaux où elle acquiert de nombreuses résistances (Folkesson *et al.* 2012). De plus, PAO favorise la formation de variants à petites colonies de *S.aureus* difficiles à éradiquer. Ces colonies particulières fournissent elle-même un avantage de survie aux autres populations de bactéries *S.aureus* en présence de PAO. Enfin, tout comme PAO, *S.aureus* peut acquérir des résistances (ex : résistance à la méticilline) (Goss & Muhlebach 2011). Trouver des antibiotiques efficaces est donc un enjeu majeur puisque les bactéries développent et partagent ces résistances par le transfert de gène horizontal (transfert de matériel génétique direct d'une bactérie à l'autre sans en être le descendant) ou encore la formation de biofilm (Sherrard *et al.* 2014). Chez les patients CF, les antibiotiques par voie orale (inhalation d'aérosol) ou intraveineuse sont utilisés pour traiter les exacerbations. Actuellement la tobramycine (*Tobi*®), la colimycine ou encore l'aztréonam (*Cayston*®) sont administrés aux patients (Durupt *et al.* 2014). Les différents axes de recherches en microbiologie portent sur la découverte de nouvelles molécules, une administration ciblée, la séquestration du fer utilisée par les pathogènes, l'inhibition du quorum sensing qui permet aux bactéries de communiquer entre elles et l'analyse du résistome, c'est à dire de l'ensemble des gènes impliqués dans les résistances aux antibiotiques (Sherrard *et al.* 2014).

1.5.4. Le développement des thérapies anti-inflammatoires

L'inflammation dans la mucoviscidose. Chez les patients CF, la réponse inflammatoire est une des principales caractéristiques de l'atteinte pulmonaire. L'absence de fonctionnalité de la protéine CFTR au pôle apicale des cellules épithéliales entraîne une diminution des ions chlorures et bicarbonates dans le liquide de surface des voies aériennes (ASL), induisant une diminution du PH, puis de la défense antibactérienne, ce qui déclenche le recrutement des neutrophiles (Cantin *et al.* 2015). La réabsorption des ions sodiques et de l'eau diminue le volume du liquide périciliaire et augmente la viscosité du mucus, ce qui favorise l'accumulation de pathogènes à la surface des cellules épithéliales (Clunes & Boucher 2008, Kamath *et al.* 2015). Des modifications lipidiques au niveau de la membrane plasmique favorisent l'activation du TLR4 par le LPS des bactéries et des protéines inflammatoires libérées par les neutrophiles. Ainsi, le complexe NF- κ B est activé et permet l'expression de cytokines telles que l'IL-8 et de MUC5AC, ce qui entraîne un recrutement plus marqué des neutrophiles et une augmentation de la viscosité du mucus (Cantin *et al.* 2015). Cette viscosité s'accroît également avec l'acidification liée à la diminution du PH, la diminution du glutathion qui est normalement sécrété par le canal CFTR (Ouellet & Bilodeau 2007) et la présence d'ADN libérés par la dégradation des neutrophiles (Cohen-Cymerknoh *et al.* 2011). Les neutrophiles actifs libèrent des protéases dont des élastases qui dégradent progressivement l'épithélium respiratoire entraînant la dilatation des bronches (Cantin *et al.* 2015). Ces cellules immunitaires créent également un stress oxydatif (Kamath *et al.* 2015) par la production de ROS (dérivés réactifs de l'oxygène), qui est normalement neutralisé par le glutathion, un antioxydant cellulaire (Gao *et al.* 1999, Ouellet & Bilodeau 2007). De plus, lorsque le stress oxydatif est trop important, la réponse inflammatoire est modulée par Nrf2 (*Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*) qui inhibe la voie NF- κ B. Lorsque le canal CFTR est inactif, la voie Nrf2 est défectueuse et la réponse inflammatoire n'est plus contrôlée (Cantin *et al.* 2015).

La combinaison de l'ensemble des dérégulations énoncées entraîne une réponse exacerbée du système immunitaire. Néanmoins, il s'agit d'une vision simplifiée des mécanismes impliqués dans l'inflammation.

La présence de neutrophiles et de cytokines (Il-8) a été détectée chez de jeunes enfants atteints de mucoviscidose, sans évidence d'infections suggérant qu'une inflammation pourrait précéder une infection par des agents pathogènes (Khan *et al.* 1995, Muhlebach *et al.* 1999). Il

est également décrit qu'en présence d'une protéine CFTR mutée mal conformée telle que la protéine p.Phe508del, un stress du réticulum endoplasmique est déclenché et entraîne l'activation de la voie NF- κ B (Weber *et al.* 2001, Knorre *et al.* 2002) et d'autres voies de signalisation (pour revue : Jacquot *et al.* 2008). L'augmentation du facteur NF- κ B et le maintien d'une réponse inflammatoire n'expliquent pas seuls la surexpression de l'Il-8. Une altération de la balance HAT/HDAC (histones acétylases/histones déacétylases) quand le canal CFTR n'est pas fonctionnel, participerait à ce mécanisme. En effet, la surexpression de l'Il-8 pourrait s'expliquer par l'hyperacétylation de son promoteur en réponse au stress oxydatif (Bartling & Drumm 2009).

D'autres part, il est décrit que les macrophages alvéolaires utilisent le canal CFTR pour maintenir un faible pH dans les lysosomes, ce qui limite la croissance des bactéries ingérées. Un défaut d'activité du canal CFTR réduit ainsi les défenses de l'hôte dans les alvéoles (Swanson 2006).

Les traitements anti-inflammatoires. Les recherches se concentrent sur différents aspects : l'utilisation d'anti-inflammatoires à large spectre, d'antimicrobiens aux propriétés anti-inflammatoires, de modulateurs du signal intracellulaire, d'antioxydants, d'antiprotéases et d'inhibiteurs de l'influx et des produits neutrophiliques (Cantin *et al.* 2015). En effet, lors de l'inflammation, les neutrophiles nécrotiques libèrent de l'ADN qui augmentent la viscosité du mucus. Le Pulmozyme (ou dornase alfa) est un traitement à base de rhDNase (déoxyribonucléase 1 recombinante humaine) dont l'action est d'éliminer l'ADN neutrophilique contenu dans les sécrétions (Diot *et al.* 2003).

1.5.5. Corriger les défauts moléculaires résultants des mutations du gène CFTR

1.5.5.1. **Corriger la protéine CFTR mutée**

Corriger l'ouverture du canal à la membrane. Les potentiateurs permettent l'amélioration de l'ouverture du canal CFTR. La molécule VX-770 (ou Ivacaftor/ Kalydeco) a été identifiée par criblage moléculaire (Van Goor *et al.* 2009). Cette molécule a actuellement une autorisation de mise sur le marché en France (depuis 2012) pour les patient porteurs de la mutation p.Gly551Asp. Depuis 2014, cette molécule est également proposée pour 8 autres

mutations de classe III. Cette molécule permet d'augmenter le VEMS, la prise de poids et de diminuer les symptômes respiratoires ainsi que la concentration des ions chlorures dans la sueur (Haute autorité de santé 2012b). Des études réalisées sur des cellules FRT (*Fischer Rat Thyroid*) exprimant 54 mutations faux sens différentes du gène *CFTR* ont montrées que le VX-707 pourrait s'appliquer à des mutations d'autres classes. En effet, ce potentiateur augmente l'activité du canal CFTR pour 34 mutations dont la mutation p.Arg117his (classe IV) (Van Goor *et al.* 2014). Un autre potentiateur, QBW251, fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase II.

Corriger la protéine. Afin que la protéine mutante p.Phe508del soit adressée à la membrane plasmique, divers correcteurs chimiques (curcumin, thaspigargine, Buphenyl, génistéine, PS-341, Miglustat, SAHA) ou pharmacologiques (VRT-325, VRT-532, Corr-4a, VX-809) font l'objet de nombreuses investigations (pour revue : Tildy & Rogers 2015). En particulier, la molécule VX-809 ou lumacaftor (Van Goor *et al.* 2011) qui stabilise le domaine MSD1 de la région N-terminale de la protéine CFTR (Ren *et al.* 2013) fait l'objet d'études cliniques avancées. Des essais de phase 2a ont montrés que cette molécule diminue chez les patients homozygotes p.Phe508del, le taux de chlore sudoripare mais n'améliore pas les signes cliniques (différence de potentiel nasal et fonction pulmonaire) (Clancy *et al.* 2012). Le VX-809 a donc été combiné avec le potentiateur VX-707 (Ivacaftor/ Kalydeco) afin que l'ouverture du canal de la protéine mutante adressée à la membrane soit améliorée. Cette combinaison nommée Orkambi est actuellement autorisée aux Etats Unis par la FDA (*US Food and Drug Administration*) pour les patients homozygotes p.Phe508del. Il faut néanmoins noter que certaines études *in vitro* ont mis en évidence que le VX-707 diminuait la stabilité de la protéine p.Phe508del à la membrane (Veit *et al.* 2014, Cholon *et al.* 2014). En France, l'autorisation de mise sur le marché d'Orkambi est en cours. Un correcteur de seconde génération nommé VX-661 a été testé en combinaison au potentiateur VX-707. Les résultats indiquent des améliorations modestes mais significatives du taux d'ions chlorure dans la sueur et des fonctions pulmonaires (Pettit & Fellner 2014, Amaral 2015). Cette combinaison est donc actuellement testée en essai clinique de phase III.

Stabiliser la protéine. Les stabilisateurs ciblent les mutations de classe VI. Il s'agit d'activateurs de la voie Rac1 tel que l'HGF (hepatocyte growth factor) qui favorisent l'ancrage de la protéine CFTR au cytosquelette d'actine par NHERF1 (Amaral 2015).

Translecture des codons prématurés (PTC). Les aminoglycosides sont des antibiotiques qui permettent la translecture des PTC en incorporant un aminoacyl-ARNt aléatoire au niveau du site A du ribosome, à la place du complexe de terminaison (pour revue: Fanen *et al.* 2014). Parmi ces molécules se trouvent la généticine (G418), la gentamine, la tobramycine et l'amikacine (Ikpa *et al.* 2014, Tildy & Rogers 2015). Une administration de gentamicine par voie nasale restaure une activité du canal CFTR chez des patients porteurs de PTC (Wilschanski *et al.* 2003). Par voie intraveineuse, cette molécule diminue la concentration de chlore dans la sueur et améliore les fonction respiratoires (Sermet-Gaudelus *et al.* 2007). Cependant l'utilisation des aminoglycosides entraînent à long terme des problèmes de toxicité (Tildy & Rogers 2015). En plus des aminoglycosides, certaines molécules de translecture sont issues de criblage moléculaire. C'est le cas de l'Altaluren ou PTC-124 (Welch *et al.* 2007). Bien que des essais cliniques de phase II étaient prometteurs (Sermet-Gaudelus *et al.* 2010, Wilschanski *et al.* 2011), l'étude de phase III n'a pas montré d'amélioration des fonctions pulmonaires. Toutefois, le traitement semble plus efficace chez les patients n'ayant pas reçus de tobramycine (Kerem *et al.* 2014). De plus, l'Ataluren est à utiliser avec précaution puisque en association avec des aminoglycosides intraveineux, elle provoque des insuffisances rénales aiguës parfois sévères (Durupt *et al.* 2014). D'autres molécules tel que le NB54 sont également décrites (Rowe *et al.* 2011). D'autre part, il est important de noter que le NMD est un paramètre important à prendre en compte avant l'utilisation de molécules de translecture pour les mutations de classe I. Une diminution du taux de transcrits diminue considérablement la probabilité d'avoir un taux de protéines fonctionnelles suffisant à la membrane plasmique. En effet, une étude a montré que ce mécanisme de contrôle des ARNs impactait sur l'efficacité de la gentamicine (Linde *et al.* 2007). De plus, il est décrit que l'utilisation des inhibiteurs du NMD tel que l'amlexanox stabilise les transcrits porteurs de PTC et induit leur translecture (Gonzalez-Hilarion *et al.* 2012).

1.5.5.2. Corriger le gène *CFTR* muté

La thérapie génique. La thérapie génique consiste à réintroduire chez un patient l'ADNc du gène *CFTR* sauvage sous contrôle d'un promoteur exogène parfaitement caractérisé afin de produire une protéine fonctionnelle. Ainsi, la thérapie génique serait applicable à toutes les classes de mutations. Deux paramètres sont à prendre en compte : l'ADN exogène (transgène) et l'agent de transfert. Ce dernier doit être sélectionné en fonction

de la taille du gène, des cellules à cibler (présence de récepteurs cellulaires si un vecteur viral est utilisé) ainsi que de la tolérance de l'hôte après des administrations répétées. Dans le cas de la mucoviscidose, le vecteur choisi doit pouvoir traverser un mucus épais et visqueux et échapper à un système immunitaire déjà bien présent (présence de pathogènes opportunistes) tout en restant intègre (Gill & Hyde 2014, Armstrong *et al.* 2014). Depuis 1993, différents vecteurs viraux (adénovirus et adéno-associés) et non viraux ont été testés (pour revue : Griesenbach & Alton 2009). Plus d'une vingtaine d'essais cliniques ont été réalisés sans succès, principalement à cause d'une faible expression du transgène liée à la présence d'une barrière intra et extracellulaire (glycocalyx, mucus, débris cellulaires ...) qui empêche l'internalisation des particules étrangères, d'une réponse inflammatoire liées à la présence de protéines virales et du développement d'une réponse immunitaire humorale empêchant la réadministration du traitement (Griesenbach & Alton 2009, Ikpa *et al.* 2014). Cependant, une étude clinique récente de phase 2b réalisée sur 140 patients atteints de mucoviscidose a permis de montrer une stabilisation significative bien que modeste des fonctions respiratoires, après traitement par thérapie génique (administration de lipides cationiques) contrairement au groupe traité par placebo (Alton *et al.* 2015).

Le "genomic editing". Différentes approches sont recherchées pour corriger le génome par l'utilisation d'outils moléculaires. Les TALEN (Trans Activator Like Effector Nucleases), les ZFN (Zinc Finger Nucleases) et le système CRISPR/Cas9 sont des nucléases qui permettent de créer des cassures doubles brins uniques et spécifiques dans le génome et qui activent les systèmes de réparation cellulaire. Ainsi, par une approche de recombinaison homologue, il est possible d'intégrer un transgène (Gaj *et al.* 2013). Une étude a montré qu'il était possible de corriger la mutation p.Phe508del par le système CRISPR/cas9 dans des cellules souches intestinales issues de patient CF. Les auteurs de ce travail ont également montré que dans les organoïdes issus de ces cellules génétiquement modifiées, le canal CFTR est actif avec un gonflement de l'organoïde après activation à la forskoline (Schwank *et al.* 2013). La correction de la mutation p.phe508del dans des cellules CFBE est également envisagée, par administration de nanoparticules comportant un ADN donneur et un oligonucléotide modifié de type PNA (*Peptide Nucleic Acid*) qui permet la formation d'une triple hélice. Récemment, chez des souris homozygotes p.Phe508del ayant reçues un traitement intranasal de ce type de nanoparticules, une correction du gène *CFTR* dans

l'épithélium nasal ($\approx 6\%$ de correction) et les poumons (1,2%) a été observée (McNeer *et al.* 2015).

1.5.5.3. Corriger l'ARNm *CFTR* muté

Réintroduire le triplet nucléotique codant la phénylalanine 508. Pour la mutation du gène *CFTR* la plus fréquente (p.Phe508del), une étude a montré qu'il était possible de corriger l'ARNm *CFTR* codant la protéine p.Phe508del par l'utilisation d'oligonucléotides formant un duplex ARN au sein duquel les 3 nucléotides correspondant à la phénylalanine 508 ont été ajoutés. Les mécanismes moléculaires restent cependant à déterminer (Zamecnik *et al.* 2004). Depuis 2015, ce type d'approche par inhalation d'oligonucléotides fait l'objet d'un essai clinique de phase I (traitement QR-010 ; société ProQR Therapeutics).

L'utilisation d'oligonucléotides pour corriger l'épissage. Des études réalisées sur l'ARN de patients porteurs de mutations d'épissage a permis d'estimer que 8% de transcrits *CFTR* sauvages permettraient d'avoir une fonction pulmonaire normale tandis que 5% de transcrits sauvages seraient associés à un phénotype atténué (Chu *et al.* 1992, Ramalho *et al.* 2002). Les défauts d'épissage peuvent être corrigés par les oligonucléotides antisens (AONs). Les AONs sont des molécules simple brin (ARN ou ADN) modifiés chimiquement pour résister à l'attaque des nucléases. Ces molécules de 15 à 20 nucléotides créent un encombrement stérique sur l'ARN, empêchant sa reconnaissance par le spliceosome (Singh & Cooper 2012). Les AONs peuvent être utilisés pour diverses applications selon les pathologies (**figure 10**): inhiber l'insertion d'un exon cryptique en masquant les nouveaux sites d'épissage reconnus par le spliceosome (site accepteur et donneur) ou des séquences activatrices (enhancers) présentes au sein du pseudoexon (Perez *et al.* 2009, Gurvich *et al.* 2008), empêcher l'utilisation d'un site cryptique (Lentz *et al.* 2013), favoriser la présence d'une isoforme (Zammarchi *et al.* 2011), inhiber le saut d'un exon en masquant une séquence silencer intronique, ISS (Hua *et al.* 2010) ou encore favoriser le saut d'un exon (pour revue : Hammond & Wood 2011, Singh & Cooper 2012, Arechavala-Gomez *et al.* 2014). Dans le cadre de la mucoviscidose, l'utilisation d'AONs a déjà été utilisé pour corriger l'insertion d'un exon cryptique situé dans l'intron 22 (IVS 19) du transcrit *CFTR*, induit par la présence de la mutation c.3717+12191C>T (c.3849+10kb C>T) (Friedman *et al.* 1999).

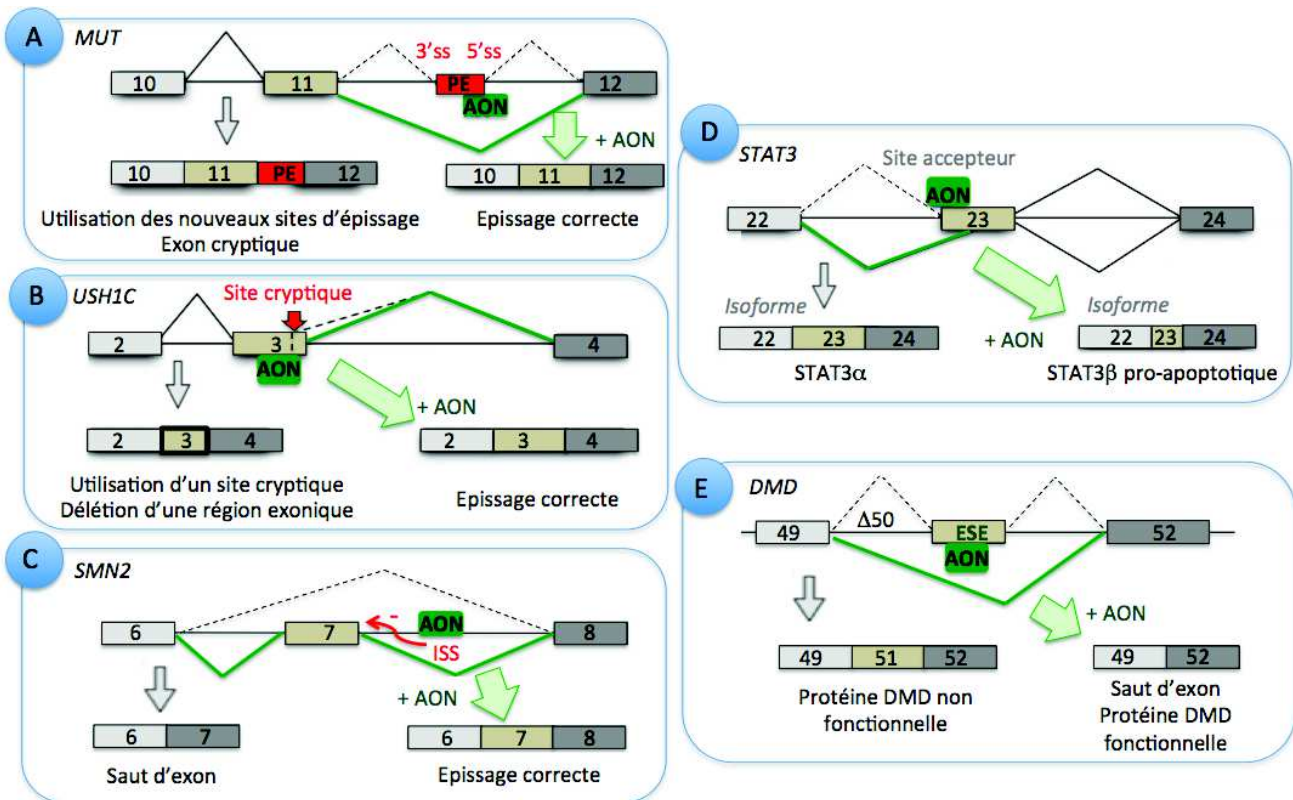


Figure 10 : Exemple d'applications des oligonucléotides antisens pour corriger l'épissage.
(Adapté de Wood *et al.* 2011, Cooper *et al.* 2012 et Gomeza *et al.* 2014)

L'épissage sans l'AON est indiqué par des pointillés (----) et la conséquence de cet épissage par une flèche grise. L'épissage avec l'AON est indiqué par un trait continu vert (—) et la correction induite par l'AON par une flèche verte. PE : pseudoexon. **Figure 10-A** : Un AON masquant le site donneur du pseudoexon situé dans l'intron 11 du gène *MUT* restaure un épissage correcte. **Figure 10-B** : Une mutation dans l'exon 3 du gène *USH1C* active un site cryptique qui entraîne l'exclusion d'une région exonique. Un épissage correcte peut être restauré en masquant ce site cryptique. **Figure 10-C** : L'inclusion de l'exon 7 du gène *SMN2* peut être réalisée en masquant une séquence silencer (ISS) présente dans l'intron 7. **Figure 10-D** : Le gène *STAT3* produit deux isoformes *STAT3α* et *STAT3β*. L'utilisation d'un AON masquant le site accepteur de l'exon 23 permet la production de la protéine proapoptotique *STAT3β*. **Figure 10-E** : La délétion de l'exon 50 du gène *DMD* entraîne un décalage du cadre de lecture et par conséquent une perte de fonction de la dystrophine. Le saut de l'exon 51 par l'utilisation d'un AON masquant une séquence enhancer (ESE) restaure le cadre de lecture et la fonctionnalité de la protéine.

En conclusion, les différentes thérapeutiques adaptées pour chaque classe de mutations sont représentées sur la **figure 11**.

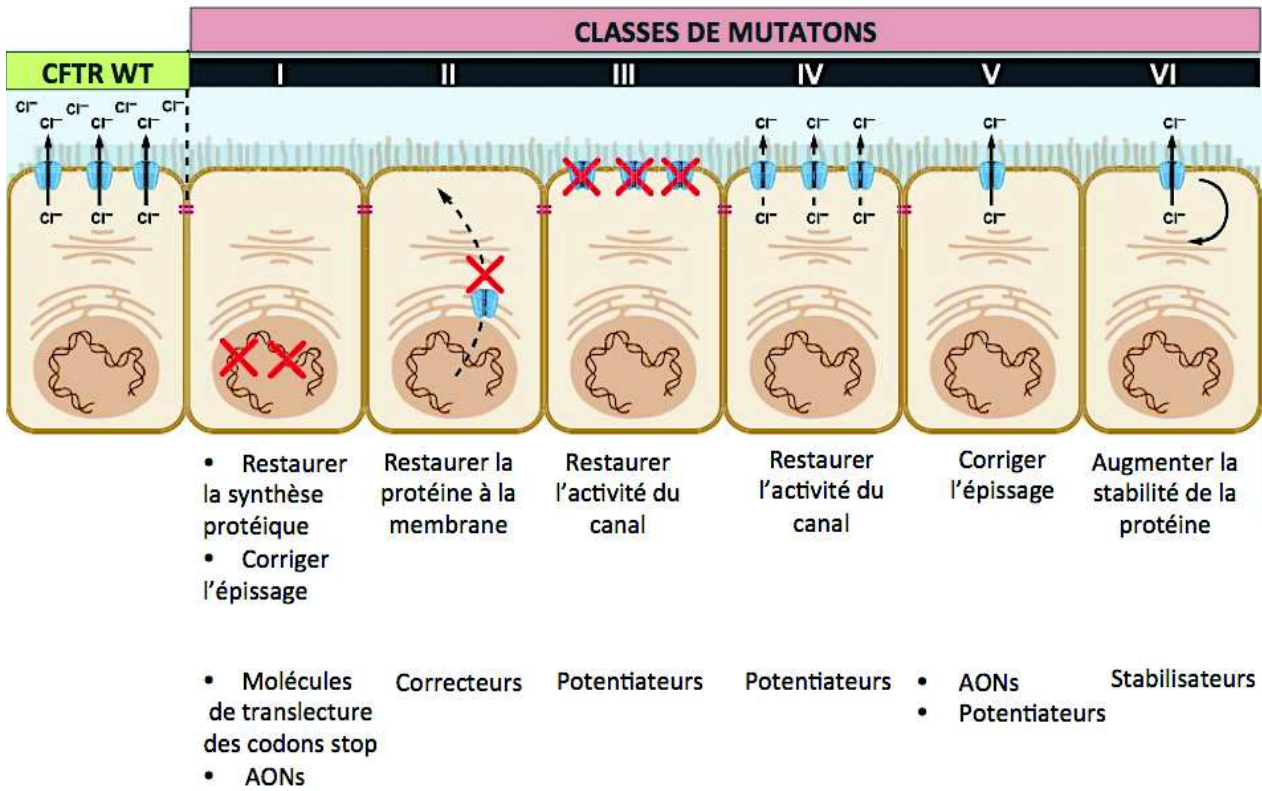


Figure 11 : Mucoviscidose et thérapies personnalisées.
(Adapté d'Amaral 2015)

2. RÉGULATION DU GÈNE *CFTR*

2.1. L'expression du gène *CFTR*

Le gène *CFTR* présente une expression restreinte à certains tissus (**figure 12**). Cette expression peut également être modulée au cours du développement.

Tissu	Expression
Pancréas	90
Vésicule biliaire	57
Colon	44
Rectum	44
Duodénum	38
Glandes salivaires	21
Petit intestin	20
Poumon	8
Appendice	5
Estomac	4
Testicule	3
Trompes de Fallope	3
Endomètre	2
Muscle lisse	2
Prostate	2
Vessie	2
Cortex cérébral	1
Foie	1
Placenta	1
Oesophage	1
Rein	1
Tissu adipeux	1

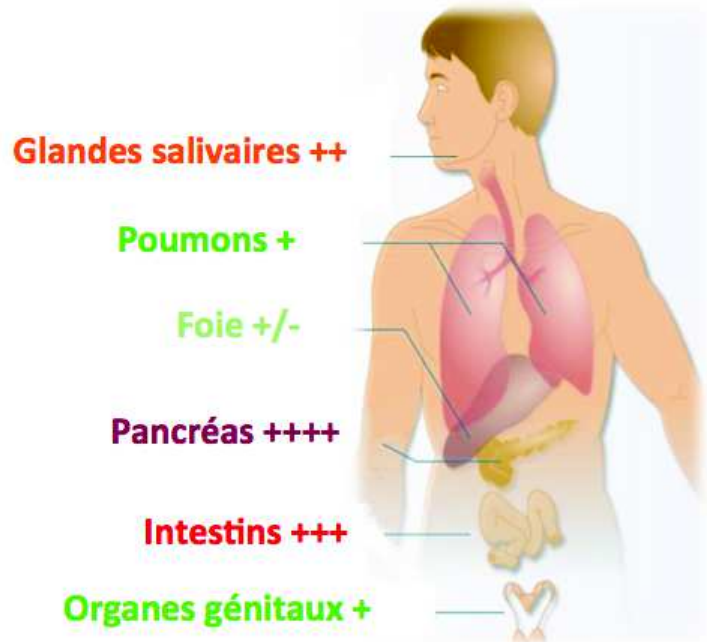


Figure 12 : Expression du gène *CFTR* dans les différents tissus humains.

(Source : <http://www.proteinatlas.org/>)

Le tableau de gauche résume des données de RNA-seq issues du séquençage de 122 tissus (32 tissus cellulaires différents). L'expression est représentée en FPKM "number of Fragments Per Kilobase gene model and Million reads"

2.1.1. L'expression tissu spécifique du gène *CFTR*

Le gène *CFTR* est exprimé dans divers organes dont l'appareil digestif (expression marquée dans le pancréas et l'intestin), l'appareil reproducteur et l'appareil respiratoire. Cette expression est retrouvée en grande majorité dans les épithéliums des organes exocrines (glandes salivaires, glandes de Brunners, crypte de Lieberkuhn, canaux déférents, cavité utérine, canaux biliaires ...) mais également dans des cellules non épithéliales (cardiomyocytes, neurones, cornée, lymphocytes, muscle lisse aortique ...) où l'expression est en général plus faible (Pour revue Trezise 2006). L'expression d'une protéine CFTR est également décrite dans l'os (Shead *et al.* 2007).

Ce paragraphe concerne davantage l'épithélium respiratoire pour détailler par la suite l'expression du gène. L'épithélium respiratoire assure la protection des muqueuses *via* la clairance mucociliaire, la régulation des flux d'ions et d'eau, la sécrétion de molécules de défense et ses complexes jonctionnels qui constituent une barrière physique avec l'environnement extérieur (Coraux *et al.* 2005). Comme illustré dans la **figure 13**, l'épithélium est pseudostratifié des bronches aux bronchioles et repose sur une lame basale qui disparaît dans les bronchioles les plus distales pour laisser place à un épithélium monostratifié. Les bronches sont constituées principalement de cellules ciliées, de cellules mucosécrétrices (ou caliciformes) et de glandes sous muqueuses. Des cellules intermédiaires (cellules cylindriques non ciliées) et des cellules neuroendocrines sont également présentes. Les bronchioles les plus proximales se caractérisent par la présence de cellules ciliées et de cellules nommées " *Club Cell* " tandis que les alvéoles comportent des pneumocytes de type I et II (Coraux *et al.* 2005; Adam *et al.* 2014; Wong & Rossant 2013).

L'épithélium respiratoire d'un patient atteint de mucoviscidose se caractérise par des lésions épithéliales, de la métaplasie malpighienne, une hyperplasie des cellules caliciformes et des cellules basales, une hypertrophie des glandes sous muqueuses, une augmentation de la hauteur épithéliale et un épaississement de la lame basale. Une fibrose de la paroi des voies aériennes et une hypertrophie du muscle lisse sont également observées (Adam *et al.* 2014).

Aucune différence de la fréquence du battement ciliaire et du nombre de cils n'est décrite pour la mucoviscidose, toutefois une désorganisation ciliaire a été rapportée (Rutland *et al.* 1983; Rayner *et al.* 1995; Zhang *et al.* 2011).

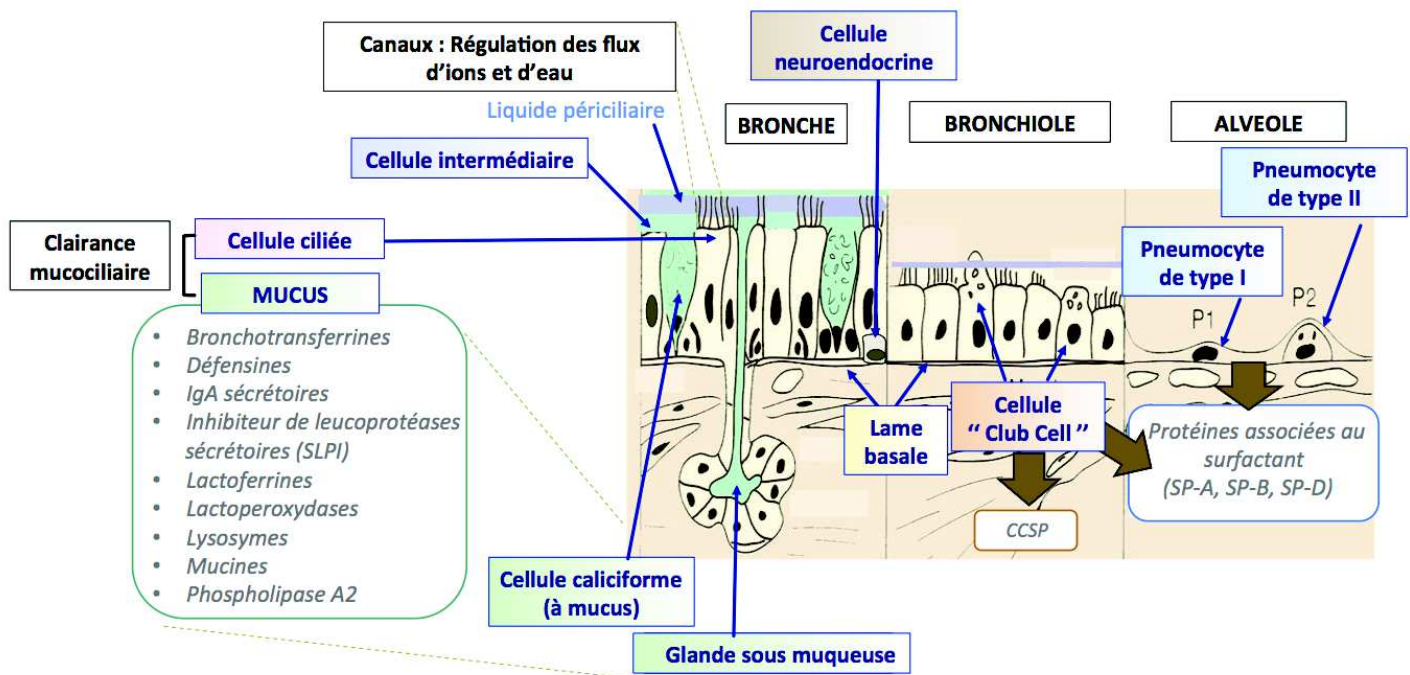


Figure 13 : L'épithélium respiratoire

Le mucus sécrète diverses molécules ayant des propriétés antimicrobiennes. Les cellules " Club Cell " et les cellules alvéolaires synthétisent les protéines associées au surfactant capables de moduler l'inflammation. Les cellules " Club Cell " sécrètent également la protéine CCSP (Coraux et al. 2005).

(Source image : http://ecours.unice.fr/radiographie_blaive/disciplines/niveaudiscipline/pneumologie/lecon1/IMG-2-41.jpg)

Au niveau pulmonaire, le taux de transcrits varie en fonction du type cellulaire. Cette expression est plus forte au niveau des voies aériennes proximales (bronches) contrairement aux régions distales (bronchioles et alvéoles) (Engelhardt *et al.* 1994). Cependant, dans la littérature, les données d'expression au niveau cellulaire sont parfois controversées.

Dans les bronches, des résultats issus de brossages ont d'abord estimé que seules 1 à 2 copies d'ARNm *CFTR* sont présentes dans les cellules épithéliales (Trapnell *et al.* 1991a) et que l'expression du gène est maximale au niveau des glandes sous-muqueuses (Engelhardt *et al.* 1992). Ainsi le gène *CFTR* serait très faiblement exprimé dans l'épithélium de surface, avec une expression plus marquée au niveau des cellules non ciliées entourant l'ouverture du conduit de la glande. L'expression est la plus forte dans la région glandulaire la plus distale dans presque toutes les cellules séreuses, contrairement au canaux collecteurs et ciliés où seulement 1 à 3% des cellules expriment fortement le gène *CFTR* (Engelhardt *et al.* 1992,

Jiang & Engelhardt 1998). D'autres études ont également détectées une expression de la protéine CFTR dans les acini et le conduit des glandes sous-muqueuses (Kälin *et al.* 1999).

Au contraire, certains travaux montrent une expression plus élevée au niveau de l'épithélium de surface et des canaux ciliés que dans les glandes. En particulier, la protéine CFTR est retrouvée au pôle apical de la totalité des cellules ciliées des bronches mais également des bronchioles (Kreda *et al.* 2005; Regnier *et al.* 2008).

Ces différentes études s'accordent néanmoins sur le fait que l'expression du gène *CFTR* est faible dans les cellules caliciformes (Engelhardt *et al.* 1992; Kreda *et al.* 2005). De plus, la présence d'une protéine mutée p.Phe508del au pôle apical des cellules épithéliales cylindriques bronchiques est également décrite, bien que cette quantité soit diminuée comparé à une protéine CFTR sauvage (Borthwick *et al.* 2011). Dans les alvéoles, les transcrits et/ou les protéines CFTR sont également détectés dans les pneumocytes de type I et II (Fang *et al.* 2006; Regnier *et al.* 2008).

Divers paramètres peuvent expliquer la variabilité des résultats observés : les techniques de détection, les techniques de prélèvement et de conservation des tissus, la qualité du matériel biologique, la zone où l'échantillon a été prélevé ... Etant donné la difficulté de travailler sur des tissus pulmonaires, d'autres modèles cellulaires alternatifs issus des voies aériennes sont étudiés. Il est décrit que la protéine CFTR est exprimée au pôle apical des cellules ciliées ainsi que dans les glandes sous muqueuses des polypes nasaux (Kälin *et al.* 1999). Dans les épithéliums issus de cellules nasales, la protéine CFTR est présente à la fois dans les cellules cylindriques ciliées et non ciliées (Penque *et al.* 2000).

2.1.2. L'expression du gène *CFTR* au cours du développement

Expression du gène CFTR au stade embryonnaire. Le gène *CFTR* est exprimé très tôt au cours de la vie. Son transcrite est détectable dans les ovocytes humains non fertilisés et les embryons au stade 2, 4 et 8 cellules, morula et blastocyste, avec une expression marquée pour le stade blastocyste (Ben-Chetrit *et al.* 2002). Une expression très précoce a également été observée chez le Xénope (Tucker *et al.* 1992). Ces données suggéraient un stockage des transcrits *CFTR* maternels issus de l'ovocyte. Il a également été décrit que le canal CFTR est actif durant la formation du blastocyste, une étape où le transport d'ions est crucial (Ben-Chetrit *et al.* 2002). Des travaux plus récents réalisés à partir d'embryons de souris et d'embryons humains, ont également mis en évidence l'implication du canal CFTR à des étapes précoces du développement pré-implantatoire (Lu *et al.* 2012).

Expression du gène CFTR au stade fœtal. Les premières études réalisées chez le fœtus ont été permises par des techniques d'hybridation *in situ*. L'étude de tissus prélevés à chaque trimestre de grossesse a permis de définir une forte expression des transcrits *CFTR* dans le pancréas, le foie, le colon (cryptes) et le petit intestin comparé à la trachée, aux bronches, aux petites voies aériennes et à l'épididyme (Tizzano *et al.* 1993). La quantification des transcrits a mis en évidence une expression similaire du gène *CFTR* dans des tissus fœtaux (2nd trimestre de grossesse) et adultes, excepté pour le poumon où le taux de transcrits est beaucoup plus marquée chez le fœtus (Trezise *et al.* 1993). Ces observations ont été confirmées par une étude réalisée sur des tissus humains issus de l'appareil respiratoire, avec une forte expression dans la trachée et les bronches, les petites voies aériennes et l'épithélium distal chez le fœtus (Tizzano *et al.* 1994). A partir du 3^{ème} trimestre de grossesse, le taux de transcrits *CFTR* diminue dans l'épithélium distal puis devient indétectable dans les alvéoles au cours de la vie aérienne. Après la naissance, les auteurs ont également observé de l'ARNm *CFTR* dans les glandes sous-muqueuses (Tizzano *et al.* 1994).

La différence d'expression du gène *CFTR* dans le poumon entre la vie fœtal et la vie aérienne, a été observée pour la première fois par des techniques de PCR quantitative (q-PCR) dans le modèle ovin (Broackes-Carter *et al.* 2002), chez qui la gestation dure environ 150 jours. Les auteurs ont mis en évidence un pic d'expression du transcrite *CFTR* au 80^{ème} jour de gestation (milieu du 2nd trimestre) puis une diminution jusqu'à la naissance. Une étude récente a confirmé la présence d'un pic d'expression du transcrite *CFTR* dans des tissus pulmonaires fœtaux humains. Des résultats de quantification par q-PCR ont montré une augmentation du

taux de transcrits *CFTR* de la 12^{ème} à la 18^{ème} semaine de grossesse puis une diminution dès la 22^{ème} semaine jusqu'à la naissance. Cette étude montre une expression maximale à la 18^{ème} semaine, période qui correspond au début du stade canaliculaire du développement du poumon (Bergougnoux *et al.* 2014) (**figure 14**). Etant donné que ce stade débute à la 16^{ème} semaine de grossesse (et se termine à la 26^{ème} semaine), il aurait été particulièrement intéressant d'avoir des données quantitatives issues d'échantillons de la 15^{ème} et 16^{ème} semaine de grossesse. Cependant l'obtention de tissus fœtaux humains reste particulièrement complexe (problèmes de réglementation et de la qualité des tissus), ce qui limite considérablement les données.

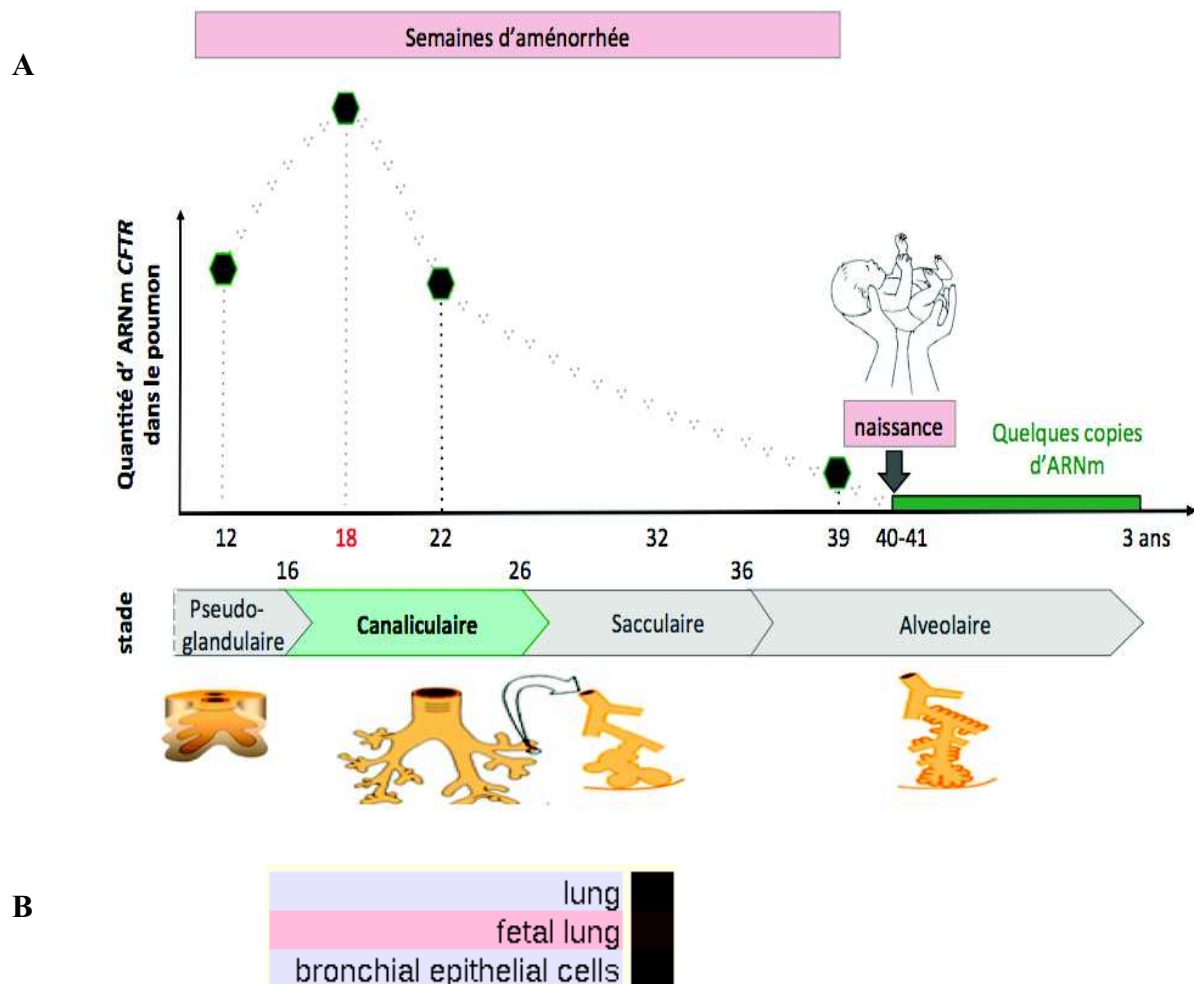


Figure 14 : Expression du gène *CFTR* dans les poumons au cours du développement

Figure 14-A : Données adaptées de Bergougnoux *et al.* 2014. **Figure 14-B** : Données issues de base de données UCSC genome browser. GNF Expression Atlas 2 Data from U133A and GNF1H Chips. La couleur rouge indique une forte expression.

2.2. Les modifications épigénétiques dans l'expression du gène *CFTR*

2.2.1. La méthylation du promoteur *CFTR*

Méthylation en condition physiologique. L'étude du promoteur *CFTR* a permis de mettre en évidence une hypométhylation de celui-ci, dans les lignées coliques et pancréatiques qui expriment fortement le gène *CFTR*. À l'inverse, une hyperméthylation est observée dans les lignées qui n'expriment pas ou très peu le gène (Koh *et al.* 1993). Cependant, entre les lignées et les tissus, une différence de méthylation du promoteur *CFTR* a été décrite (Denamur & Chehab 1995). De plus, il a été montré qu'un promoteur *CFTR* transcriptionnellement inactif peut être associé à une faible méthylation (cultures primaires de fibroblastes de peau), ainsi cette modification épigénétique n'est pas la principale cause de l'inactivation de la transcription du gène *CFTR* (Lewandowska *et al.* 2010). Enfin, l'étude de différents tissus fœtaux ou adultes prélevés à partir de nombreux organes, a permis de confirmer que la méthylation du promoteur ne participait pas à la régulation tissu spécifique du gène *CFTR* (Bergougnoux *et al.* 2014). En accord avec les travaux précédemment décrits (Denamur & Chehab 1995), cette étude montre une méthylation du promoteur *CFTR* relativement faible dans les tissus.

Méthylation dans les cancers. Un promoteur *CFTR* méthylé est retrouvé dans certains cancers (Moribe *et al.* 2009, Son *et al.* 2011, Zhao *et al.* 2012). Par exemple, il a été montré que dans les cellules A549 issus d'un adénocarcinome pulmonaire, un traitement au 5-aza-2'-deoxycytidine (inhibiteur de la méthylation) permet de ré-exprimer le gène *CFTR* (Son *et al.* 2011).

Méthylation au cours d'un stress du réticulum. Une hyperméthylation du promoteur *CFTR* a été décrite au cours d'un stress du réticulum. En effet, il a été montré que l'activation de la réponse UPR diminue le taux de transcrit *CFTR* via des mécanismes impliquant la fixation du facteur ATF6 et la méthylation d'îlots CpG au niveau du promoteur *CFTR*. Ces deux mécanismes permettent le recrutement de protéines HDAC (histones désacétylases). Ainsi les auteurs montrent que la répression transcriptionnelle peut être levée via un double traitement avec un agent hypométhylant (5'azacytidine) et un inhibiteur des HDAC (trichostatine A, TSA), montrant ainsi une action combinée de ces deux mécanismes épigénétiques (Bartoszewski *et al.* 2008b).

2.2.2. L'acétylation des histones dans la régulation du promoteur *CFTR*

L'importance des modifications post-traductionnelles des histones dans l'expression du gène *CFTR*, a été montrée par l'utilisation d'un inhibiteur d'HDACs. En effet, un traitement par la TSA (trichostatine A) des cellules PANC-1 induit une activation transcriptionnelle du promoteur *CFTR* à travers une modification de la structure chromatinienne (Li *et al.* 1999).

2.3. La régulation transcriptionnelle du gène *CFTR*

2.3.1. Les caractéristiques du promoteur *CFTR*

L'expression tissulaire du gène *CFTR* est en contradiction avec la structure même de son promoteur qui possède toutes les caractéristiques d'un gène de ménage. En effet, le promoteur *CFTR* ne contient pas de boîte TATA. Sa séquence est riche en GC et présente de multiples sites d'initiation de la transcription (TSS) dont l'utilisation dépend du tissu et du stade développemental (Chou *et al.* 1991, Yoshimura *et al.* 1991a, Koh *et al.* 1993, White *et al.* 1998) (**figure 15**). Dans le poumon fœtal, la transcription est initiée au nucléotide -132 (TSS majeur) tandis que dans le poumon adulte, le TSS est positionné au nucléotide -69 en amont du codon d'initiation de la traduction (White *et al.* 1998). En plus de cette spécificité, le promoteur *CFTR* comporte également de nombreux motifs de fixation pour les protéines AP-1, AP-2, SP1 (*Specificity Protein 1*) et des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE : *Glucocorticoid Receptor Element*) (Chou *et al.* 1991, Yoshimura *et al.* 1991a).

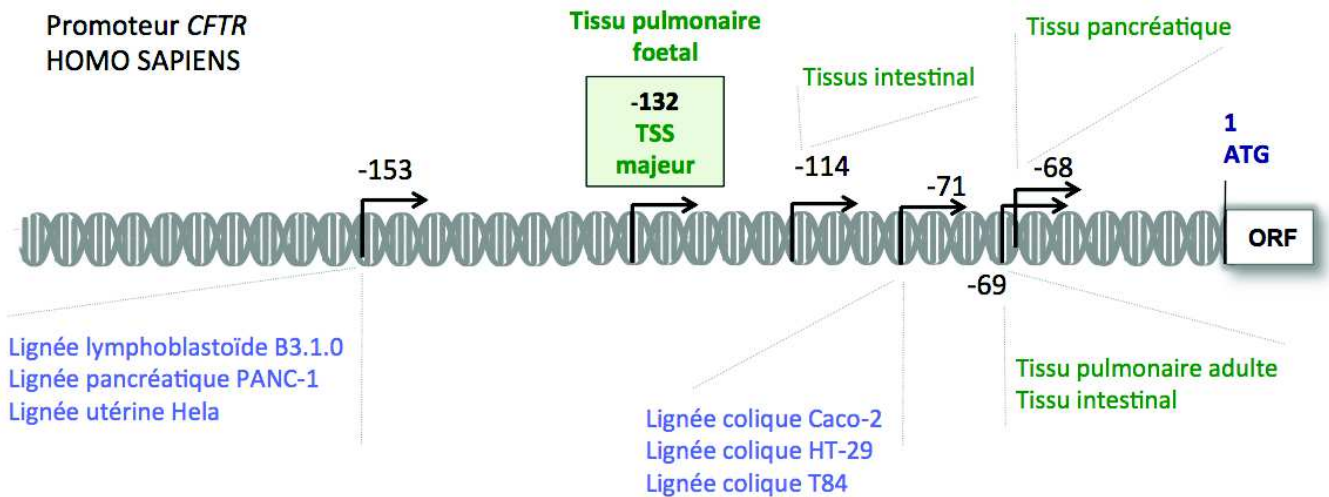


Figure 15 : Principaux sites d'initiation de la transcription (TSS) décrits dans le promoteur *CFTR* humain.

(Données issues des travaux de Yoshimura *et al.* (1991a), Koh *et al.* (1993) et White 1998 *et al.*)

2.3.2. La régulation en condition physiologique

Composition nucléotidique. Le promoteur *CFTR* est riche en séquence G/C (environ 65 %) et par conséquent contient des motifs de fixation pour le facteur de transcription Sp1 (Yoshimura *et al.* 1991a). En effet, l'identification d'un variant du promoteur chez un patient CF, a permis de mettre en évidence la fixation des facteurs ubiquitaires Sp1 et USF. Ces deux protéines activent la transcription et cette activation peut être renforcée par un effet coopératif des deux facteurs (Taulan *et al.* 2007).

Motif cis-régulateur Y box. Des études fonctionnelles réalisées à partir de constructions contenant des séquences de taille variable du promoteur *CFTR*, ont mis en évidence une région importante pour la transcription (expression basale ou induite par l'AMPc). Cette séquence comporte une boîte CCAAT inversée (ou Y box) où se fixent les facteurs C/EBP (*CCAAT Enhancer Binding Protein*), CREB (*cAMP Response Element Binding protein*) et ATF (*Activating Transcription Factor*) (Pittman *et al.* 1995).

De plus, au niveau de ce motif, une compétition de fixation a été décrite entre les facteurs activateurs ATF-1 et l'histone acétyl transférase hGCN5, et le complexe répresseur CDP/cut (*CCAAT displacement protein/cut homologue*) qui recrute l'histone déacétylase HDAC1 (Li *et al.* 1999). Cette même équipe a également mis en évidence une interaction entre la protéine CBP (*CREB-Binding protein*), l'histone acétyltransférase PCAF (p300/*CREB-Binding protein associated factor*) et le complexe CDP/cut acétylé par cette dernière (Li *et al.* 2000).

Motif cis-régulateur CRE. Tout comme l'ouverture de son canal, le gène *CFTR* est régulé par l'AMPc. Son promoteur comporte un motif CRE où se fixent les protéines CREB et ATF (Matthews & McKnight 1996). Ainsi, l'inhibition de la PKA via l'utilisation d'un dominant négatif (protéine mutée au niveau du domaine R) ou d'un traitement chimique (H-89) réprime la transcription du gène *CFTR*. En effet, le facteur CREB est activé par phosphorylation *via* la PKA dont l'activité est elle-même dépendante de l'AMPc (McDonald *et al.* 1995).

Motif cis-régulateur CARG-like. L'étude de variants retrouvés chez des patients CF a permis d'identifier un motif CARG-like situé au niveau du promoteur minimal (Romey *et al.* 2000). Des études fonctionnelles ont ensuite montré qu'il existait une compétition de fixation entre deux facteurs antagonistes au niveau de cette région : le facteur SRF qui active la transcription et le facteur YY1 qui est un fort répresseur (René *et al.* 2005).

Motif cis-régulateur AP-1. Le promoteur du gène *CFTR* contient des motifs de fixation pour le facteur AP-1 (Chou *et al.* 1991), un complexe pouvant être activé par les esters de phorbol. Des travaux ont montré que le PMA (phorbol myristate acetate) diminuait le taux de transcrite *CFTR* (Trapnell *et al.* 1991b, McDonald *et al.* 1995). Cependant, la répression de la transcription *via* la fixation directe du facteur AP-1 sur le promoteur *CFTR* n'a pas encore été démontrée. Seul l'identification d'un variant permettant la fixation du complexe AP-1 en contexte muté est décrit (Bienvenu *et al.* 1995).

Motif cis-régulateur FOXI. L'étude d'un variant identifié chez un patient atteint d'ABCD a permis de mettre en évidence la fixation de facteurs répresseurs FOXI, 33 pb en amont du TSS majeur, spécifiquement dans les cellules issues des canaux déférents (Lopez *et al.* 2011).

L'ensemble des facteurs se fixant sur ces motifs est représenté sur la **figure 16**.

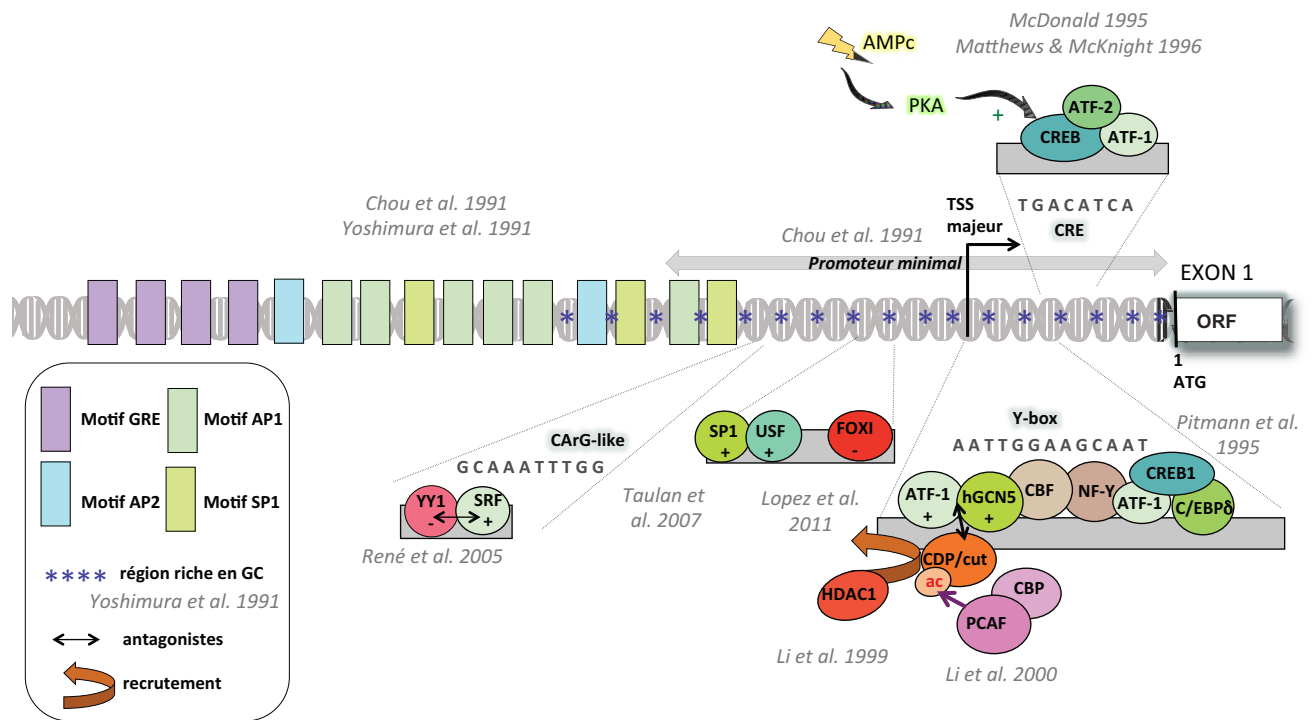


Figure 16 : Régulation transcriptionnelle du gène *CFTR* en condition physiologique.

Le promoteur minimal est défini -226pb en amont du TSS majeur et s'étend jusqu'à la position +98 (Chou et al. 1991). Le **TSS majeur** est défini -132 pb en amont de l'ATG (White et al.1998). Les séquences suivantes sont annotées par rapport à l'ATG : **séquence CRE** position -119/-112 (Li et al. 1999); **séquence CCAATi (Y box)** positions -119/-132 (Pittman et al. 1993); **motif CArg-like** positions -240/-249 (René et al. 2005); **Motifs AP1** présents aux positions -354pb, -557pb et -753pb, -816pb, -1047pb, -1129pb (Chou et al. 1991, Yoshimura et al. 1991a); **Motifs GRE** présents aux positions -1012pb, -1211pb, -1297pb, -1537pb (Yoshimura et al. 1991a); **Motifs AP2** présents aux positions -415pb, -1178pb (Yoshimura et al. 1991a); **Motifs Sp1** présents aux positions -326pb, -405pb, -1021pb (Yoshimura et al. 1991a); **Motif SP1/USF** présent à -226pb (Taulan et al. 2007), **Motif FOXI** présent à -165 pb (Lopez et al. 2011).

2.3.3. La régulation au cours d'un stress cellulaire

Effet d'un stress oxydatif. Un stress oxydatif induit par un traitement au curcumin ou au t-BHQ diminue le taux d'ARNm *CFTR* et augmente le taux de protéine Nrf2. Cette dernière permet le recrutement dans le noyau du facteur répresseur YY1 et favorise sa fixation au niveau du promoteur *CFTR*. Des expériences de vecteurs rapporteurs (constructions avec le promoteur *CFTR*) ont montré que ces deux facteurs diminuaient l'activité luciférase et que l'effet était maximal par l'action combinée de ces deux protéines. Au contraire, une surexpression du facteur Keap1 (répresseur de Nrf2) diminue à la fois le taux des protéines Nrf2 et YY1 nucléaires et augmente l'activité luciférase (René et al. 2010).

Effet d'un stress nitrosatif. Un stress nitrosatif impacte également la transcription du gène *CFTR*. Il a été montré que l'utilisation du GSNO (*S-nitrosoglutathion; donneur de NO*) à faible concentration facilite la fixation du facteur Sp3 (*Specificity protein 3*) sur le promoteur *CFTR*, augmentant ainsi le taux d'ARNm *CFTR*. Au contraire à forte concentration, le GSNO inhibe la fixation de Sp3 et facilite la fixation du facteur répresseur Sp1 diminuant ainsi le taux d'ARNm *CFTR* (Zaman *et al.* 2004).

Effet d'un stress du réticulum. L'activation de la réponse UPR (*Unfolded Response Protein*) diminue le taux d'ARNm *CFTR* dans des cellules exprimant un gène *CFTR* endogène mais pas dans des lignées exprimant un gène *CFTR* recombinant. Ces observations suggèrent l'implication des régions régulatrices dans la répression du taux de transcrit *CFTR* induite par la réponse UPR (Rab *et al.* 2007). Cette hypothèse a été confirmée par des expériences de vecteurs rapporteurs qui ont permis de mettre en évidence que le promoteur minimal du gène *CFTR* est impliqué dans la répression transcriptionnelle *via* la fixation du facteur ATF6 (Bartoszewski *et al.* 2008b).

Effet des cytokines. L'IL-1 β module le taux de transcrits *CFTR* dans les cellules T84 de manière dose dépendante (Cafferata *et al.* 2000). L'utilisation d'un dominant négatif dirigé contre la protéine I κ B α abolit l'effet activateur de la cytokine, montrant l'implication du facteur NF- κ B dans le mécanisme d'action (Cafferata *et al.* 2001). Dans le modèle pulmonaire Calu-3, l'Il-1 β augmente la transcription du gène *CFTR* en activant le facteur de transcription NF- κ B qui se fixe directement au niveau du promoteur *CFTR*, sur un motif κ B-like response element (Brouillard *et al.* 2001).

Effet de l'hypoxie. L'administration d'un traitement au diméthylalylglycine (DMOG; entraîne l'accumulation d'HIF-1 α), au chlorure de cobalt (CoCl₂; molécule qui induit une hypoxie) ou la culture dans une atmosphère ne contenant que 1% de O₂, induit une diminution du taux d'ARNm *CFTR* dans des cellules coliques et pulmonaires (Guimbellot *et al.* 2008). Cette diminution est également observée dans les voies respiratoires, le système gastro-intestinal et le foie de souris maintenues pendant 7 jours dans un milieu hypoxique. Le taux d'ARNm *CFTR* est également diminué dans les trachées de patients CF avant transplantation, contrairement aux donneurs. Enfin, un stress hypoxique entraîne la fixation du facteur HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*) au niveau du promoteur *CFTR*, réprimant ainsi la transcription de ce gène. Des expériences de ChiP (*Chromatin Immunoprecipitation*

assays) réalisées dans un modèle colique ont démontré la fixation directe de ce facteur à -850 bp en amont de l'ATG (Zheng *et al.* 2009).

L'ensemble des facteurs est représenté sur la **figure 17**.

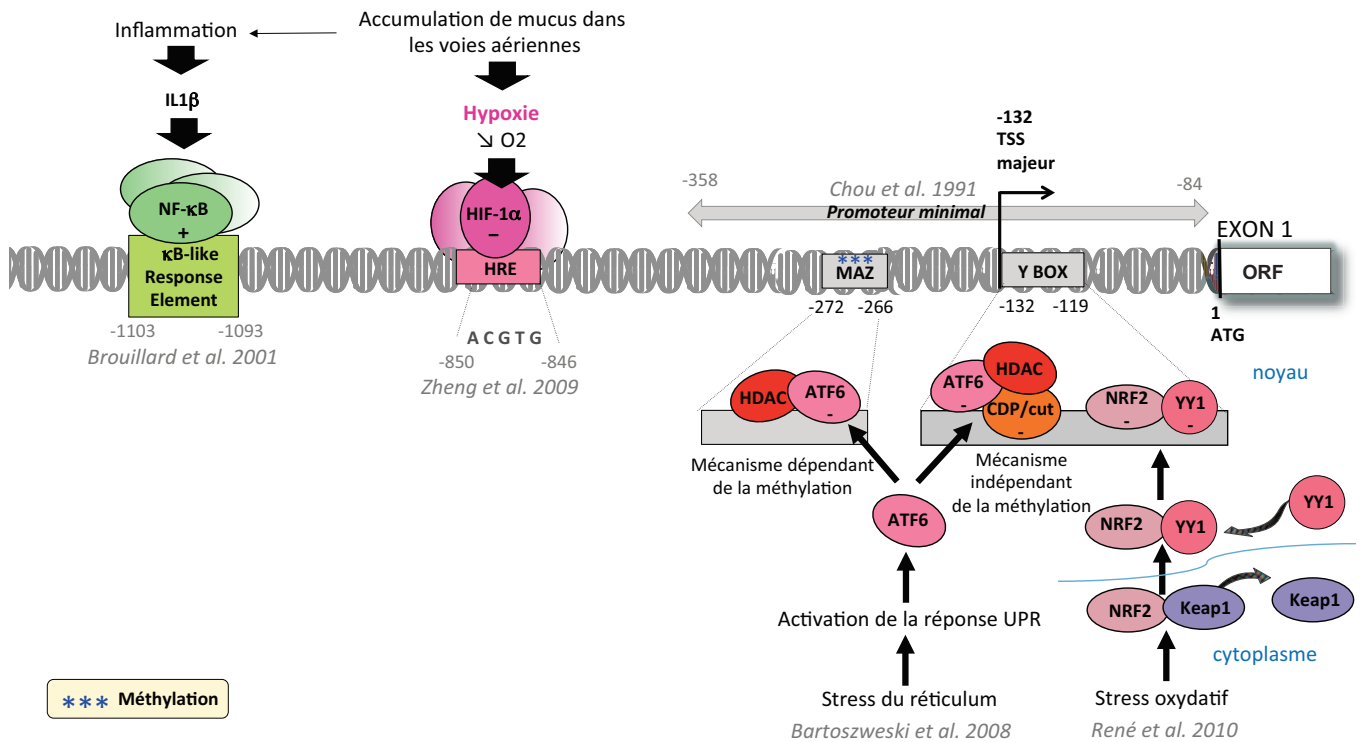


Figure 17 : Régulation transcriptionnelle du gène *CFTR* lors d'un stress cellulaire.

Les motifs suivant sont annotés en fonction de l'ATG. ***κB-like response element*** : positions -1103/-1093pb (Brouillard *et al.* 2001); ***HRE*** : positions -850/-846 pb (Zheng *et al.* 2009); ***domaine MAZ*** : -272pb/-266pb (Bartoszewski *et al.* 2008).

2.1. L'organisation de la chromatine

Le contrôle de l'expression spatio-temporelle d'un gène dépend d'éléments *cis*-régulateurs ainsi que de la fixation d'éléments *trans*-régulateurs sur ces séquences spécifiques. Définir précisément les interactions et actions combinées de tous ces éléments régulateurs dans les différents tissus, afin de mieux comprendre la régulation du gène *CFTR*, reste un challenge. De plus, certaines de ces séquences *cis* sont très distantes du gène *CFTR*, parfois localisées à plusieurs mégabases (Gheldof *et al.* 2010).

Différents niveaux d'organisation ont été décrits pour moduler l'expression du gène *CFTR* :

- La structure de la chromatine avec les sites hypersensibles à la DNase où se fixent différents facteurs protéiques.
- La conformation chromatinienne avec l'organisation des nucléosomes et les interactions longues distances.

2.1.1. Les sites hypersensibles à la DNase (DHS) et la fixation des facteurs *trans*

2.1.1.1. Introduction

Une chromatine ouverte et active est sensible au clivage par l'enzyme DNase I et est accessible aux facteurs de transcription. Ces séquences fonctionnellement liées à l'activité transcriptionnelle des gènes sont des marqueurs d'éléments *cis*-régulateurs tels que les promoteurs, les amplificateurs (enhancers), les insulateurs (insulators), les inactivateurs (silencers) et les régions de contrôle du locus (LCR : Locus Control Region) (Thurman *et al.* 2012). Sur les insulateurs se fixent des protéines qui peuvent soit créer une barrière afin d'empêcher la propagation de l'hétérochromatine (barrier insulator), soit former des complexes afin de bloquer les interactions amplificateur-promoteur (enhancer blocking insulator) (Heger & Wiehe 2014). Ainsi, le locus *CFTR* et ses régions adjacentes ont été explorés afin de déterminer précisément ces sites DHS (*DNase I Hypersensitive Sites*). L'ensemble des régions DHS décrites est résumé sur le **tableau 2**.

Ancienne nomenclature (legacy name)	Nouvelle nomenclature	HT29	Caco2	Capan I	Panc1	primaire c. déférent	primaire épидидyme	RVP	REP	MCF7	37566	Calu3	tissu poumon foetal	tissu poumon adulte	Beas-2B	primaire HTE	primaire NHBE	16HBE14o-	fibroblaste
-79.5kb	/	+ (a)	+ (a)	+ (a)		+ (a)	+ (a)	+ (a)	+ (a)	+ (a)	+ (a)								
-44kb	/						+ (f)					+ (g)			- (g)	+ (g)	- (g)	+ (g)	- (g)
-35kb	/						+ (f)					+ (g)			- (g)	+ (g)	detectable (h)	+ (g)	- (g)
-20.9kb	/	+ (a)	+ (a)	+ (a)		+ (a)	+ (a)	+ (a)	+ (a)	+ (a)	+ (a)								
-3,4 kb	/											- (g)			- (g)	- (g)	- (g)	+ (g)	- (g)
185 + 10 kb (IVS1)	c.53 + 10 kb (IVS1)	+ (b,f)	+ (b,f)	+ (b)		+ (b)	+ (b)	+/- (b)	+/- (b)	- (b)	- (b)								
185 + 20 kb (IVS1)	c.53 + 20 kb (IVS1)											+ (g)			- (g)	- (g)	- (g)	- (g)	- (g)
296 +4.4kb (IVS2)	c.164 +4.4kb (IVS2)	- (d)	+ (d)	+ (e)		- (d)	- (d)			+ (d)	- (d)	- (d)							
405 +0.7kb (IVS3)	c.273 +0.7kb (IVS3)	- (d)	+ (d)	- (d)		- (d)	- (d)			+ (d)	- (d)	- (d)							
1716 +13.2kb (IVS10)	c.1584 +13.2kb (IVS11)	- (d)	+ (d)	- (d)		- (d)	- (d)			- (d)	- (d)	- (d)							
1716 +13.7kb (IVS10)	c.1584 +13.7kb (IVS11)	- (d)	+ (d)	- (d)		- (d)	- (d)			- (d)	- (d)	- (d)							
1716 +23kb (IVS10)	c.1584 +23kb (IVS11)	- (d)	+ (d)	- (d)		- (d)	- (d)			- (d)	- (d)	- (d)							
1811 +0.8kb (IVS11)	c.1679 +0.8kb (IVS12)	+ (f)	+ (f)				+ (f)					+ (g)			- (g)	+ (g)	+ (f,g)	+ (g)	- (g)
3120 +1kb (IVS16)	c.2988 +1kb (IVS18)											+ (g)			- (g)	- (g)	- (g)	- (g)	- (g)
3120 +3kb (IVS16)	c.2988 +3kb (IVS18)	+ (d)	+ (d)	+ (d)		- (d)	- (d)			+ (d)	- (d)	+ (d)							
3271 +0.7kb (IVS17a)	c.3139 +0.7kb (IVS19)	+ (d)	+ (d)	+ (d)		- (d)	- (d)			+ (d)	- (d)	+ (d)							
3600 +7kb (IVS18)	c.3468 +7kb (IVS21)	+ (d)	+ (d)	+ (d,e)		- (d)	- (d)			+ (d)	- (d)	+ (d)							
3600 +10kb (IVS18)	c.3468 +10kb (IVS21)															+ (f,g)			
3849 +12.5kb (IVS19)	c.3717 +12.5kb (IVS22)															+ (f,g)			
4005 +4kb (IVS20)	c.3873 +4kb (IVS23)	- (d)	+ (d)	- (d)		+ (d)	+ (d)			- (d)	- (d)	+ (d)							
4095 +7.2kb (IVS21)	c.3963 +7.2kb (IVS24)	+ (d)	- (d)	- (d)		- (d)	- (d)			- (d)	- (d)	- (d)							
4374 +1.3kb (IVS23)	c.4242 +1.3kb (IVS26)															+ (f,g)	+ (f,g)		
+5.4kb	/	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	+ (c)	- (c)	- (c)	+ (c)	+ (c)					
+6.8kb	/	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	+ (c)	+ (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	+ (c)					
+7kb	/	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	- (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)					
+7.4kb	/	- (c)	+ (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	- (c)	+ (c)					
+15.6kb	/	+ (c,f)	+ (c,f)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	+ (c)	- (c)	- (c)	- (c)	+ (c)		+ (f)	+ (f)		- (f)
+21.5kb	/											- (g)			- (g)	+ (g)	+ (g)	- (g)	- (g)
+36.6kb	/											+ (g)			- (g)	+ (g)	+ (g)	- (g)	- (g)
+48.9kb	/	+ (f)	+ (f)				+ (f)					+ (g)			+ (f,g)	+ (f,g)	+ (f,g)	+ (g)	+ (f,g)

Tableau 2 : Les principaux DHS décrits dans le gène CFTR.

Les DHS (sites hypersensibles aux DNases) présents sur le locus CFTR sont indiqués par la couleur verte tandis que les DHS absents sont indiqués par la couleur orange. (a) Smith et al. 1995; (b) Smith et al. 1996; (c) Nuthall et al. 1999b; (d) Smith et al. 2000; (e) Phylactides et al. 2002; (f) Ott et al. 2009b; (g) Zhang et al. 2012; (h) Zhang et al. 2013.

2.1.1.2. Les DHS dans la région promotrice

Les premières études ayant montrées la présence de DHS dans la région promotrice, ont été réalisées dans la lignée colique HT-29. Ces régions sont décrites à -3 kb, -1.6 kb, -0.9 kb et -0.2 kb en amont du TSS majeur (Yoshimura *et al.* 1991b). Dans le modèle colique T84, d'autres DHS situés à -0.8 kb, -0.4 kb et +0.2 kb du TSS majeur ont été identifiés (Koh *et al.* 1993).

2.1.1.3. Les DHS longues distances situés dans la région 5'

Deux DHS situés à -79.5 kb et -20.9 kb (*nommé initialement -20.5kb*) en amont de l'ATG de l'exon 1 du gène *CFTR* sont présents, et cela indépendamment du taux du transcrits *CFTR* retrouvé dans les cellules (Smith *et al.* 1995). Des travaux ont montré que la délétion du DHS -20.9 kb dans des modèles Caco-2 *via* l'utilisation de YACs (région de 310 kb comprenant le gène *CFTR*), diminue de 60% la transcription du transgène. Ainsi, ces premières études montrent que cette région est importante dans l'expression du gène *CFTR* (Nuthall *et al.* 1999a). En effet, le DHS -20.9kb est un insulateur (*enhancer-blocker*) où se fixe la protéine CTCF (*CCCTC-binding factor*) (Blackledge *et al.* 2007). Cette région est également enrichie en protéine RAD21, une molécule appartenant au complexe de la cohésine (Ott *et al.* 2009b). Les insulateurs sont importants puisque le gène *CFTR* est entouré des gènes *ASZ1* et *CTTNPB2* qui présentent un pattern d'expression différent. Ainsi ces séquences insultrices empêchent des interactions inappropriées avec les éléments régulateurs des gènes voisins (Gosalia & Harris 2015). Des travaux plus récents ont également montré que le facteur *SIN3A* interagissait avec le facteur CTCF au niveau du DHS -20.9kb (Ramachandran *et al.* 2012) et ont mis en évidence la présence des protéines CTCF et RAD21 au niveau du DHS -79.5kb (Gosalia *et al.* 2014). D'autre part, une étude dans des modèles respiratoires a permis d'identifier les DHS situés à -44kb, -35kb et -3.4kb en amont de l'ATG. Des expériences de vecteurs rapporteurs ont mis en évidence une activité enhancer de ces DHS dans la lignée 16HBE41o- contrairement au modèle colique Caco-2. (Zhang *et al.* 2012, Zhang Z. *et al.* 2015). Le DHS -35kb permet le recrutement du complexe NF-Y dépendant de l'enrichissement en H6K4me1 (démonstré *via* la déplétion de SETD7, une lysine méthyltransferase) et des facteurs *IRF1/2* qui ont un rôle antagoniste. Les auteurs expliquent que dans les lignées Calu-3 et 16HBE14o- qui expriment *CFTR*, le taux d'ARNm *IRF1* est

supérieur à celui d'*IRF2*, à l'inverse des cultures primaires HTE et NHBE où le taux de transcrite *CFTR* est faible. Ainsi dans les cellules 16HBE41o-, la déplétion de IRF1 et la surexpression de IRF2 diminuent le taux d'ARNm *CFTR*. D'autre part, les auteurs ont observé que la déplétion de NF-YA (sous unité du complexe NF-Y) diminue l'occupation de Sin3A et augmente celle de l'histone acétyltransférase p300, à différents endroits du locus *CFTR* (Zhang *et al.* 2013). Le DHS -44kb quant à lui module l'expression du gène *CFTR* via un site ARE (*Antioxydant Response Element*) dans les voies respiratoires. En condition normale, ce site est occupé par le complexe répresseur Bach1 (*BTB and CNC homology 1*)/ MafK (*v-Maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K*). Après un traitement antioxydant au sulforaphane, ce complexe est remplacé par le complexe activateur Nrf2/MafK, augmentant ainsi l'expression du gène *CFTR* (Zhang Z. *et al.* 2015).

2.1.1.4. Les DHS situés dans les introns

Divers DHS ont été décrit dans les introns 1, 2, 3, 11, 18, 19, 21, 23 et 24 (Smith *et al.* 2000). **Le DHS c.53 +10kb de l'intron 1** est spécifique aux cellules exprimant le gène *CFTR* (lignées HT29, Caco2, Capan I, cultures primaires issues du conduit genital) (Smith *et al.* 1996). Des expériences de vecteurs rapporteurs ont montré que l'association du promoteur *CFTR* à cette région, permettait d'augmenter une activité luciférase dans le modèle Caco-2, contrairement aux cellules pulmonaires 16HBE14o- (Smith *et al.* 1996). D'autres part, des expériences réalisées sur des souris transgéniques exprimant le gène *CFTR* humain via l'introduction d'un YAC (*Yeast Artificial Chromosome*), ont mis en évidence que la délétion de cette région diminuait le taux d'ARNm *CFTR* exogène d'environ 60% dans le tissu intestinal mais n'avait pas d'effet dans le tissu pulmonaire. Cette différence d'expression a également été observée dans la lignée Caco-2 (Rowntree *et al.* 2001). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) réalisées dans des cellules intestinales ont permis de mettre en évidence que les facteurs HNF1 α (*Hepatocyte Nuclear Factor-1 α*), CDX2 (*Caudal-type homeobox 2*) et TCF4 (*T cell factor 4*) se fixaient sur cette région qui est caractérisée par une acétylation de l'histone H4 (modification épigénétique caractéristique d'une ouverture chromatinienne) (Paul *et al.* 2007). L'importance du facteur HNF1 α a été confirmée par des expériences de vecteurs rapporteurs, via l'utilisation de constructions associant le promoteur *CFTR* et la région DHS de l'intron 1 dégénérée au niveau du site de fixation de cette protéine (Ott *et al.* 2009a). Enfin une étude plus récente via l'utilisation de

shARN a montré que la protéine CHD6 jouait un rôle dans le recrutement des protéines HNF1 α et CDX2 au niveau de l'intron 1 (Sancho *et al.* 2015). Des expériences de vecteurs rapporteurs ont montré que l'association du promoteur *CFTR* au **DHS c.1679 + 0.8 kb de l'intron 12** augmentait fortement l'activité luciférase dans le modèle Caco-2. Au niveau de ce site se fixent les facteurs CDX2, FOXA1, FOXA2 et HNF1 α . Ainsi, l'utilisation d'une construction associant le promoteur *CFTR* à cette région dégénérée au niveau des sites de fixation de ces protéines, diminue l'activité luciférase comparé au vecteur contrôle (Kerschner & Harris 2012). En plus des deux DHS situés dans les introns 1 et 12 qui contiennent des enhanceurs et présentent un site de fixation pour le facteur HNF1, d'autres DHS situés dans les introns 11, 19 et 23 comportent également des sites de fixation pour cette protéine importante pour la régulation du gène *CFTR* (Mouchel *et al.* 2004). En effet, il a été montré que la surexpression de HNF1 α augmente le taux d'ARNm *CFTR* dans ce modèle Caco-2 et que des souris KO pour HNF1 α présentent un taux d'ARNm *CFTR* plus faible dans l'intestin que les souris sauvages (Mouchel *et al.* 2004). De plus, une étude suggère que les DHS c.164 + 4.4kb et c.3468 + 7kb situés dans les introns 2 et 21, induisent l'expression du gène *CFTR* spécifiquement dans les cellules pancréatiques (Phylactides *et al.* 2002). Il est décrit que le DHS de l'intron 21 et le DHS c.1584 + 13.2kb situé dans l'intron 11 activent la transcription du gène *CFTR* en réponse respectivement à la mitomycine C (antibiotique) et à la forskoline (activateur de l'adénylate cyclase) (Phylactides *et al.* 2002). Au niveau de l'intron 11 se fixent également les protéines FOXA1 et FOXA2 (Kerschner & Harris 2012) qui influencent l'ouverture de la chromatine et dont dépend la fixation des protéines HNF1 α et Cdx2 (Kerschner *et al.* 2014). En effet, il a été montré que l'utilisation de siARNs dirigés contre FOXA1 et FOXA2 est associée à une diminution l'ouverture de la chromatine au niveau des DHS11a et 11b (Kerschner *et al.* 2014). D'autre part, des expériences de ChiP réalisées dans la lignée pancréatique Capan-I ont permis de mettre en évidence la fixation du facteur PBX1 au niveau des DHS c.2988 +3kb de l'intron 18 et c.3139 +0.7kb de l'intron 19. De plus, certains DHS sont caractéristiques des cellules respiratoires et plus précisément des cultures primaires (HTE, NHBE). C'est le cas du DHS c.4242 +1.3kb (région enrichie en H3K4me1, un marqueur caractéristique des éléments enhanceurs), situé dans l'intron 26 qui présente une activité activatrice (Zhang *et al.* 2012).

2.1.1.5. Les DHS longues distances situés dans la région 3'

Une étude réalisée dans divers modèles cellulaires a décrit la présence de cinq DHS situés dans la région 3' du gène *CFTR*. Il s'agit des DHS +5.4 kb, +6.8 kb, +7 kb, +7.4 kb et +15.6 kb (Nuthall *et al.* 1999b). Le DHS +6.8kb est présent dans les cellules épithéliales issues du conduit génital et de poumons matures (Nuthall *et al.* 1999b). Plus précisément, ce site est un insulateur où se fixe le facteur CTCF (Blackledge *et al.* 2009). Le DHS +15.6 kb est retrouvé dans plusieurs lignées et tissus qui expriment le gène *CFTR* (Nuthall *et al.* 1999b). Des expériences de EMSA ont mis en évidence que sur cette région se fixent des facteurs impliqués dans l'expression du gène *CFTR* (Nuthall *et al.* 1999b) tels que AP-1 (Trapnell *et al.* 1991b), C/EBP (Matthews & McKnight 1996) et CREB/ATF (Pittman *et al.* 1995). L'étude de deux variants a également permis de montrer la fixation des facteurs ARP-1 et HNF-4 dans cette région (Rowntree & Harris 2002). De plus, ce site présente également une activité insulatrice bien que contrairement au DHS +6.8kb, cette activité semble indépendante du facteur CTCF. Néanmoins, il est décrit que les facteurs RXR α et VDR (récepteurs nucléaires) se fixent sur cette région (Blackledge *et al.* 2007). Des études plus récentes, ont montré la présence de ce site dans des cultures primaires issues des voies aériennes (HTE, NHBE) où l'expression du transcrit *CFTR* est faible (Zhang *et al.* 2012). Le DHS +48.9kb est localisé dans le gène *CTTNBP2* en aval du gène *CFTR*. Ce site est enrichi en protéines CTCF et RAD21 (Ott *et al.* 2009b, Gosalia *et al.* 2014), tout comme la région +83.7 kb identifiée à l'aide de la base de données ENCODE (Gosalia *et al.* 2014).

Pour conclure, l'ensemble de ces DHS a permis de définir plusieurs zones transcriptionnellement actives dont certaines présentent une cellule ou tissu spécificité.

2.1.2. L'organisation des nucléosomes

L'étude de la région promotrice du gène *CFTR* a permis d'identifier 4 régions dépourvues de nucléosomes nommées NFR (*Nucleosome Free Region*) (**figure 18**). NFR1 présente une tissu spécificité et constitue avec NFR4 une région où des complexes protéiques se fixent. Des expériences de vecteurs rapporteurs (cellules 16HBE14o-) ont montré que la dégénérescence de la région NRF1 diminuait de 90% l'activité luciférase contrairement à celle de la région NFR4 qui augmente cette dernière de 26% (Ott *et al.* 2012).

L'étude d'un locus de 250 kb a permis de mettre en évidence la présence de NFR dans de multiples types cellulaires, au niveau des DHS -20.9kb et +6.8kb. Ces données suggèrent la présence de facteurs communs au niveau de ces sites (Yigit et al. 2013, Gosalia & Harris 2015). Ce travail a également montré une NFR au niveau du DSH c.53 +10 kb de l'intron 1 dans le modèle Caco-2 et a confirmé la fixation du facteur FOXA1 au niveau de cette région contrairement au modèle 16HBE41o- où cette NFR est absente. De plus, l'étude des régions NFR a permis de mettre en évidence plusieurs sites de fixation pour la protéine BAF155, notamment au niveau du site -35kb retrouvé dans le modèle 16HBE41o- mais également des sites de fixation des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) (Yigit *et al.* 2013). BAF155 est une protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine. Ce facteur est décrit comme un régulateur positif de gène *CFTR* puisque l'utilisation d'un shRNA dirigé contre le transcrit *BAF155* entraîne une diminution de l'ARNm *CFTR* dans les cellules pancréatiques CF-PAC (Sancho *et al.* 2015).

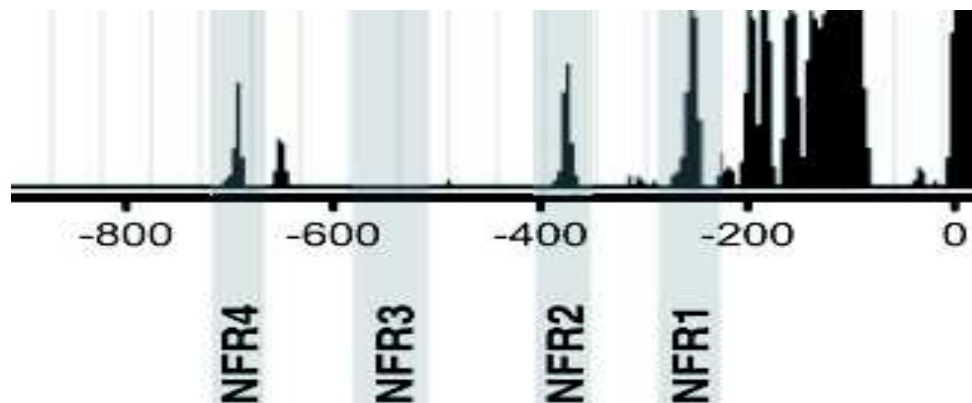


Figure 18 : Répartition des nucléosomes au niveau de la région promotrice du gène *CFTR*

Localisation des régions dépourvues de nucléosomes (NRF) dans les cellules 16HBE14o- (D'après Ott et al. 2012).

2.1.3. Les interactions longues distances du gène *CFTR*

Grâce à des approches de Capture de Conformation Chromosomique (*3C* : *Chromosome Conformation Capture*) qui est une technique qui permet d'étudier les interactions ADN-ADN longues distances médiées par des protéines, des interactions entre le DHS +6.8kb (région 3') où se fixe le facteur CTCF et le promoteur *CFTR* ont été mis en évidence dans des cultures primaires de l'épididyme (Blackledge *et al.* 2009; Ott *et al.* 2009c). Dans le modèle Caco-2, une interaction du DSH c.53 +10kb de l'intron 1 *via* HNF-1 et le promoteur *CFTR* a également été décrite (Ott *et al.* 2009a)

Une étude à plus large échelle réalisée à partir de différents modèles cellulaires a permis de montrer des interactions entre le promoteur *CFTR* et quatre régions intra- et inter-géniques spécifiquement dans les cellules exprimant le gène *CFTR* (**figure 19**). Ces régions sont situées à -80kb (élément I) et -20kb (élément II) du TSS, dans l'intron 12 (élément III) et dans la région 3' en position + 15.3kb (élément IV) (Gheldof *et al.* 2010).

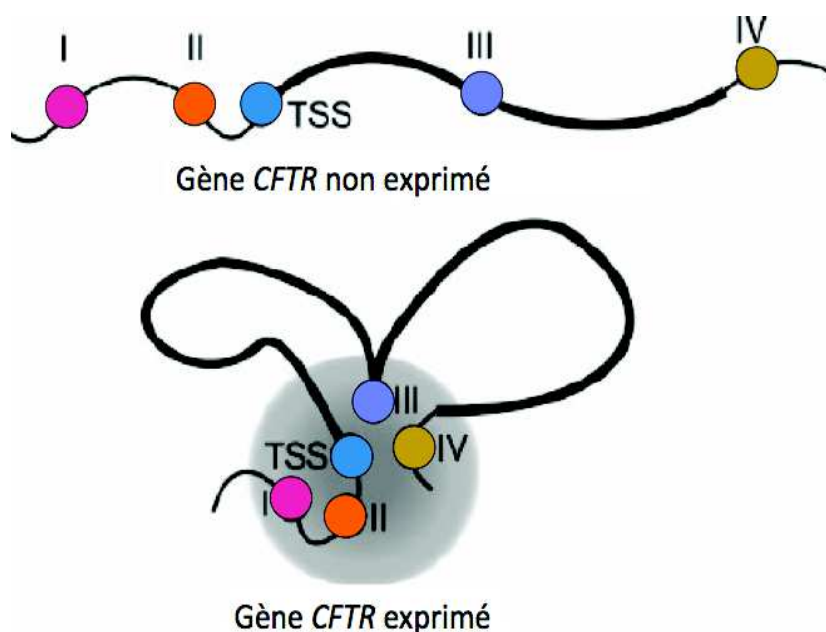


Figure 19 : Interactions du gène *CFTR*.

Interactions longues distances entre la région promotrice (TSS), une région située dans l'intron 12 (III) et des régions situées en 5' (I, II) et 3' du gène (IV), dans les cellules exprimant ou non le gène CFTR (Adapté de Gheldof et al. 2010).

Plus récemment dans le modèle Caco-2, la déplétion des facteurs FOXA1 et FOXA2 a été décrite pour altérer l'accessibilité de la chromatine (modification des marques épigénétiques H3K27ac et H3K4me2) (Kerschner *et al.* 2014) et diminuer les interactions entre le promoteur *CFTR*, l'intron 11, l'intron 12 et la région 3' (Kerschner *et al.* 2014, Gosalia *et al.* 2014). De plus, les complexes CTCF/cohésine sont impliqués dans le maintien et la stabilisation de ces interactions. L'utilisation d'un siARN dirigé contre ces protéines entraîne une relocalisation nucléaire du gène *CFTR* et augmente son expression dans le modèle Caco-2 (Gosalia *et al.* 2014). Au contraire, la déplétion de CTCF dans le modèle CF-PAC réduit le taux de transcrits *CFTR* (Sancho *et al.* 2015).

Récemment, le facteur CHD6 (*Chromatine Helicase DNA-binding 6*) a été décrit pour se lier sur le locus *CFTR* dont l'intron 1. L'utilisation d'un shRNA dirigé contre le transcrit *CHD6* diminue les interactions entre le promoteur et les introns 1 et 12 dans le modèle Caco-2 ainsi que le taux de transcrit *CFTR* (modèles Caco-2 et CF-PAC), suggérant son implication dans la structure du gène. CHD6 est une protéine qui interagit avec une multitude de facteurs dont CTCF (Sancho *et al.* 2015).

L'ensemble des différents facteurs se fixant au niveau des DHS est résumé sur la **figure 20** qui conclut le paragraphe 2.1.2.

2.2. Régulation post-transcriptionnelle du gène CFTR

2.2.1. L'épissage

2.2.1.1. Le processus d'épissage

Il est estimé qu'environ 90% des gènes humains subissent un épissage alternatif (Singh & Cooper 2012; Pedrotti & Cooper 2014; Sterne-Weiler & Sanford 2014).

Les sites d'épissage et les séquences régulatrices. L'épissage est une étape qui a lieu dans le noyau de la cellule de manière coordonnée avec l'étape de transcription. Ce mécanisme est assuré par un complexe nommé spliceosome et permet l'excision des introns suivit de la ligation des exons adjacents par deux réactions de transétérification. L'épissage nécessite la présence de séquences spécifiques (**figure 21**) situées au sein de l'intron : un site donneur (GU) situé en 5' de l'intron, un site accepteur (AG) situé en 3' ainsi qu'un site de branchement YNYURAC (Y= pyrimidine, R= purine) et une région riche en polypyrimidine (Y)_n en amont du site accepteur (Lewandowska 2013, Lee & Rio 2014). L'épissage peut être influencé par des séquences régulatrices :

- des enhanceurs, c'est à dire des séquences *cis*-régulatrices où se fixent des protéines qui favorisent le recrutement des facteurs généraux d'épissage, tels que les ESE (*Exon Splicing Enhancer*) et les ISE (*Intron Splicing Enhancer*).
- des silencers, c'est à dire des éléments *cis*-régulateurs où se fixent des protéines qui inhibent le recrutement de la machinerie d'épissage, tels que les ESS (*Exon Splicing Silencer*) et les ISS (*Intron Splicing Silencer*) (Baralle & Baralle 2005).

Parmi les protéines qui se fixent sur les éléments enhanceurs, se trouvent les protéines SR, riches en sérine et arginine, importantes dans la délimitation de l'exon même. En effet, les protéines SR favorisent la reconnaissance de l'exon en recrutant les composants du pré-spliceosome au niveau des sites d'épissages adjacents ou en antagonisant les effets des ESS alentours qui au contraire empêchent le recrutement de la machinerie d'épissage *via* le recrutement des protéines hnRNP. Dans les introns, les séquences silencers (ISS) quand à elles empêchent la formation de pseudo exons introniques et l'utilisation de sites d'épissage cryptiques (Sterne-Weiler & Sanford 2014).

U snRNPs	Poids Moléculaire	U snRNAs
U1	248,1 kDa	U1 snRNA
U2	987,4 kDa	U2 snRNA
U5	1055,7 kDa	U5 snRNA
U4/U6	589,1 kDa	U4 snRNA U6 snRNA

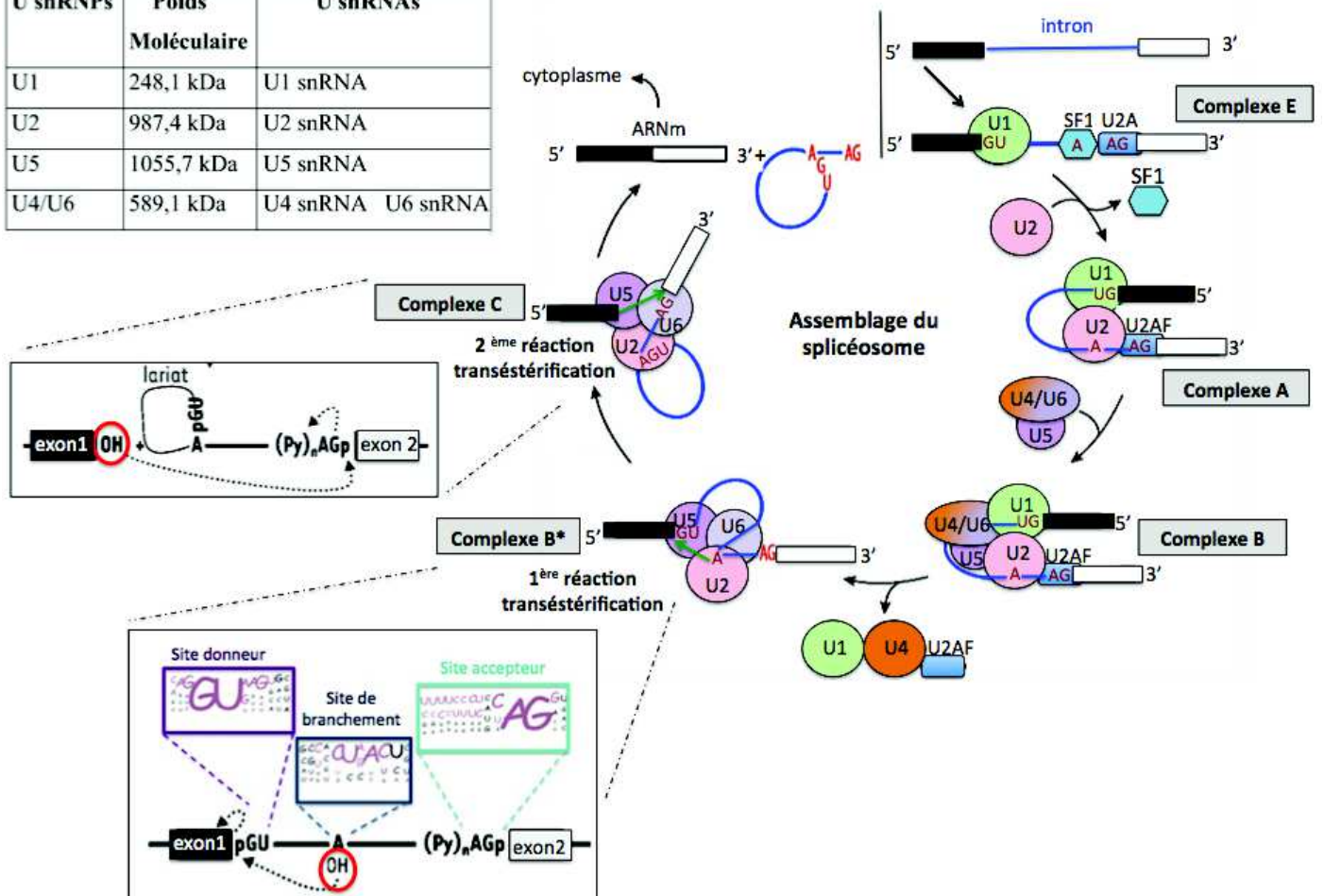


Figure 22 : Mécanisme d'épissage
(Adapté de Corcos & Solier 2005 et Van Der Feltz *et al.* 2012)

Étape 1 : U1 snRNP reconnaît le site donneur GU situé en 5' de l'intron et le facteur SF1 se fixe sur le point de branchement. Les facteurs U2AF-65 et U2AF-35 se fixent respectivement sur la séquence polypyrimidine et le site accepteur AG situé en 3' de l'intron pour former l'hétérodimère U2AF. L'ensemble de ces facteurs forme le complexe E. **Étape 2 :** U2 snRNP remplace ensuite le facteur SF1 sur le point de branchement ce qui permet un changement de conformation de l'ARNm. L'ensemble forme alors le complexe A (préspliceosome). **Étape 3 :** Le tri snRNP U4/U6-U5 se fixe ensuite au complexe A pour former le complexe B (spliceosome précatalytique). **Étape 4 :** La dissociation de U1 snRNP, U4 snRNP et U2AF permet de former le complexe B* et de réaliser la première réaction de trans-estérification. **Étape 5 :** La formation du complexe C permet ensuite de générer un ARNm épissé et un lariat d'intron.

La réaction d'épissage est initiée par la fixation de U1 snRNP au niveau du site d'épissage situé en 5', sur un motif composé de 6 nucléotides (site donneur) GU/RAGU (R= purine) (Lewandowska 2013, Pedrotti & Cooper 2014). Au niveau du point de branchement se fixe le facteur SF1 tandis que les protéines SR (SRSF2 et ZRSR2) se fixent au niveau d'un ESE. Les facteurs U2AF1 et U2AF2 sont ensuite respectivement recrutés au niveau du site accepteur (AG) et de la région riche en polypyrimidine (Pedrotti & Cooper 2014). Dans un premier temps, le groupement 2' hydroxyle (OH) de l'adénosine du site de branchement attaque le premier phosphate situé en 5' de l'intron, ce qui permet la formation d'un lasso intermédiaire et entraîne la libération de l'exon situé en 5' de ce complexe. Le 3' hydroxyle de l'exon 5' libre attaque ensuite le dernier phosphate situé en 3' de l'intron, libérant ainsi l'ARNm et le lasso d'intron (Baralle & Baralle 2005, Lee & Rio 2014). Ces étapes faisant intervenir les différents composants du splicéosome sont représentées sur la figure 22.

2.2.1.2. Les exons alternatifs du transcrit *CFTR*

L'ARNm mature *CFTR* est composé de 27 exons et sa taille est de 6,5kb. Toutefois, la présence d'exons surnuméraires dans la région 5' est décrite. Deux populations d'ARNm dépourvus de l'exon 1 et contenant les exons -1a/1a/2 et -1a/2 ont été identifiés dans les modèles T84 et Caco-2 (Koh *et al.* 1993). Ces transcrits alternatifs ont également été observés dans le tissu pulmonaire. Plus précisément dans le poumon fœtal, les transcrits -1a/1a/2 et -1a/2 sont détectables au second trimestre de grossesse et leur taux diminue entre la 14^{ème} et 17^{ème} semaine d'aménorrhée (Mouchel *et al.* 2003), une période de transition entre le stade pseudoglandulaire et caniculaire. Deux isoformes Ov1aS/2 et Ov1aL/2 excluant également l'exon 1 ont été décrites chez le mouton (Mouchel *et al.* 2003). L'isoforme -1a/1a/2 ne permet pas la production d'une protéine tandis que l'isoforme -1a/2 permet de générer une protéine tronquée dont la traduction est initiée dans l'exon 4 (Lewandowska *et al.* 2010). De plus, la présence d'une isoforme 1a-L/2 a été décrite chez un patient souffrant de polypose nasal (Hinzpeter *et al.* 2014). L'exon -1, spécifique au tissu testiculaire et régulé durant la spermatogénèse, a été mis en évidence chez la souris. Cet exon contient une séquence Y box qui active la transcription, et lorsqu'il est rabouté à l'exon 1, permet l'exclusion d'un uORF qui réduit l'efficacité de la traduction (White *et al.* 1998). Il faut cependant noter que l'homme et la souris ne partagent qu'un fragment de 34 bp situé dans la région -149/-116 pb en amont de l'ATG (Denamur & Chehab 1994). Chez le lapin, les exons alternatifs -1A, -1B

et -1C permettent l'expression de différentes isoformes d'ARNm *CFTR* régulées au cours du développement cardiaque (Davies *et al.* 2004).

2.2.1.3. Introduction aux défauts d'épissage

Généralités. Les défauts d'épissage peuvent entraîner un saut d'exon, l'inclusion de séquences introniques, la dérégulation de l'épissage alternatif ou l'inclusion de pseudoexons (figure 23) (Singh & Cooper 2012).

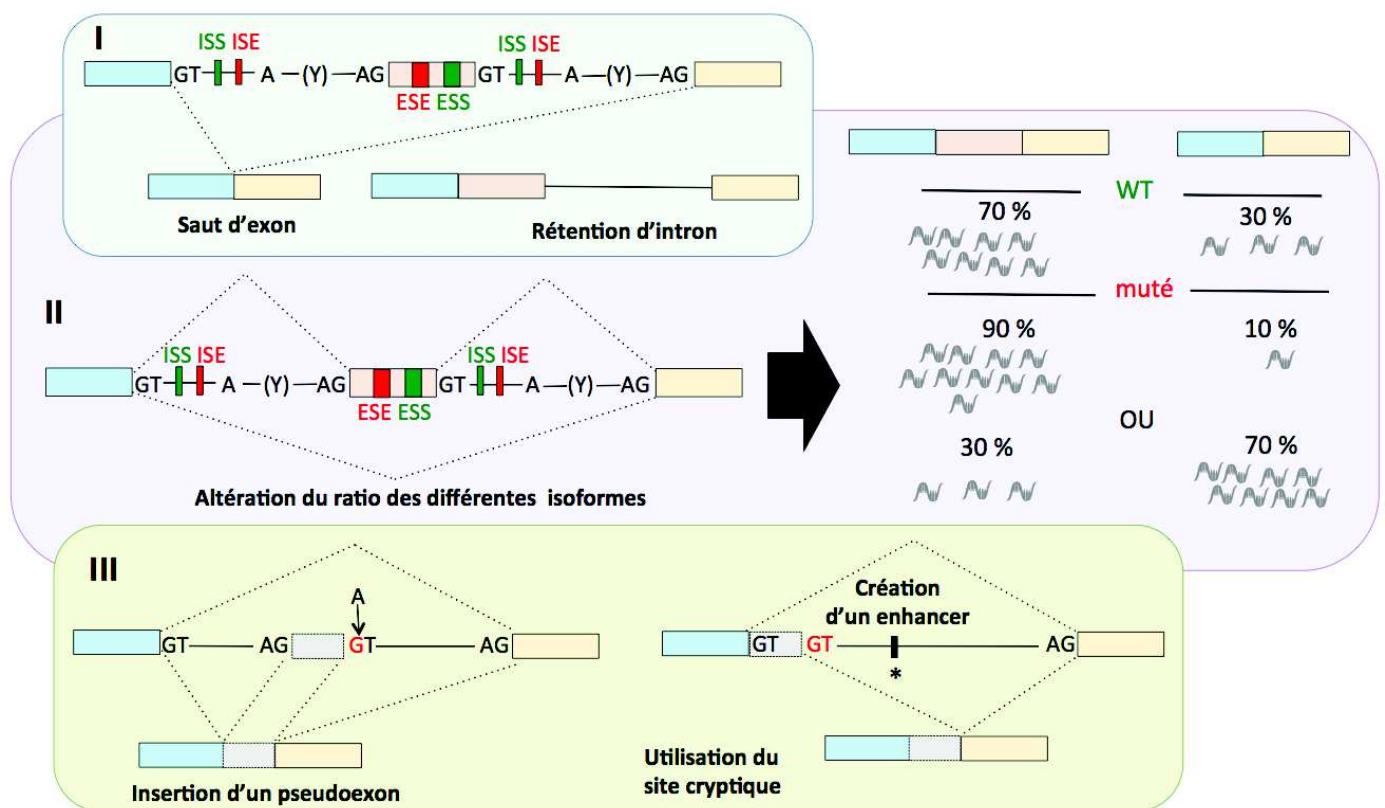


Figure 23 : Les différents défauts d'épissage
(Adapté de Singh & Cooper 2012)

Les défauts d'épissage peuvent entraîner un saut d'exon ou une rétention d'intron, l'altération du ratio des différentes isoformes et l'inclusion de pseudoexons. L'utilisation de site cryptique peut également entraîner la rétention partielle d'une région intronique adjacente à l'exon.

Par conséquent, ces défauts peuvent modifier le cadre de lecture et ainsi créer un ARNm qui contient un codon stop prématuré. Ce type de message est ensuite dégradé par le NMD (Non sense Mediated Decay) (Hammond & Wood 2011). Les défauts d'épissage peuvent être la conséquence de mutations situées sur les pré-messagers au niveau de séquences *cis*-régulatrices (**figure 24**) ou d'une modification de l'expression, de la localisation ou de l'activité des éléments *trans*-régulateurs (mécanisme fréquent dans les cancers) (Pedrotti & Cooper 2014). Ces modifications héréditaires ou sporadiques entraînent des défauts de reconnaissance des séquences ADN par le splicéome et modifient ainsi l'épissage du pré-messager (Hammond & Wood 2011). Les mutations qui impactent les dinucléotides adjacents situés en 5' ou 3' des exons représentent environ 10% des mutations liées aux maladies héréditaires. Toutefois, il reste difficile d'évaluer la proportion des mutations qui impactent les séquences régulatrices introniques ou exoniques (ISR : intronic regulatory elements, ESR : exonic regulatory elements) (Sterne-Weiler & Sanford 2014).

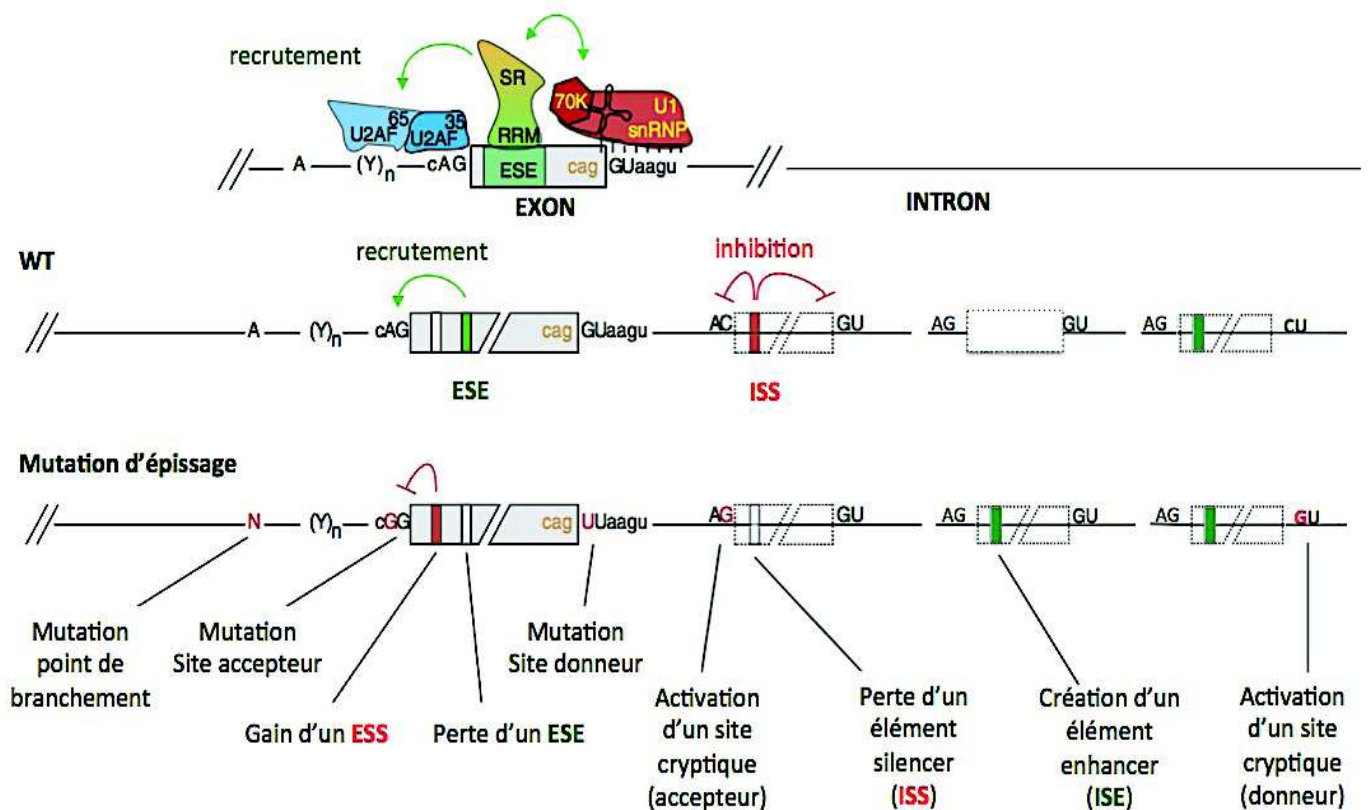


Figure 24 : Les mutations pouvant affecter le processus d'épissage.
(Adapté de Sterne-Weiler & Sanford 2014 et Dhir & Buratti 2010)

Cas des pseudoexons (ou exons cryptiques). Les pseudoexons sont des séquences dans les introns dont les régions flanquantes contiennent des sites d'épissage reconnus par le spliceosome. Leur taille est généralement comprise entre 50 et 300 nucléotides (Hammond & Wood 2011). La plupart des pseudo-exons résultent de la création d'un nouveau site accepteur ou donneur d'épissage fort dans les séquences introniques consécutives à la présence d'une mutation. Bien que ce mécanisme soit mineur, les exons cryptiques peuvent également résulter de la création d'un point de branchement (Meili *et al.* 2009). La création ou la délétion de séquences régulatrices d'épissage (**figure 24**) a également été décrite pour affecter l'épissage normal des transcrits (Hammond & Wood 2011), en particulier par la création de nouvelles séquences enhanceurs permettant le recrutement de protéines SR (Dhir & Buratti 2010). C'est le cas de la mutation c.903 +469T retrouvée dans le gène *MTRR* qui crée un ESE au sein de l'exon cryptique, où se fixent les protéines SF2/ASF (Homolova *et al.* 2010). D'autre part, la présence d'un exon cryptique peut résulter de la perte d'un élément silencieux telle que la séquence ISPE (Intron-Splicing Processing Element) décrite dans le gène *ATM*, où se fixe le complexe U1snRNP (Pagani *et al.* 2002). Enfin bien que peu étudié, il est également décrit que les éléments *trans*-régulateurs peuvent influencer l'insertion des pseudoexons (Dhir & Buratti 2010).

2.2.1.4. Les défauts d'épissage du gène *CFTR*

Il est décrit qu'environ 11% des altérations totales du gène *CFTR* correspondent à des mutations d'épissage. Dans les introns, la proportion de substitutions définies comme variant ou potentiel variant d'épissage représentent environ 60% (**voir tableau 3**) de la totalité des altérations décrites dans ces régions, néanmoins ce pourcentage est sous-estimé car les régions introniques profondes sont très peu explorées et certaines altérations ne sont pas encore caractérisées.

Description de la base de donnée genet.sickkids	Proportion
Sans description	11,6%
Variant d'épissage	39,8%
Variant d'épissage dont l'impact n'est pas certain	19,0%
Variation de séquence	21,4%
Variation de séquence dont l'impact n'est pas défini	6,8%
Polymorphisme	0,7%
Variant d'épissage ? / variation de séquence ?	0,3%
Inconnu	0,3%

Tableau 3 : Description des substitutions identifiées dans les introns du gène *CFTR*.
(Source : Base de données genet.sickkids, 2015)

Les mutations du gène CFTR au niveau de séquences consensus. L'environnement nucléotidique au niveau des séquences consensus joue un rôle essentiel dans la reconnaissance de l'ARNm par le spliceosome. Ainsi, les mutations au niveau de ces régions (**figure 21**) impactent le processus d'épissage normal des transcrits. Parmi les mutations d'épissage décrites pour le gène *CFTR*, on retrouve des mutations qui affectent le site donneur (Hull *et al.* 1993; Zielenski *et al.* 1993), le site accepteur (Hull *et al.* 1993) et les nucléotides adjacents à ces sites (Highsmith *et al.* 1997).

Le saut de l'exon 10. Le saut de l'exon 10 qui code la partie terminale du domaine NBD1 de la protéine CFTR (Strong *et al.* 1993), fait l'objet de nombreux travaux. L'épissage alternatif de cet exon peut être physiologique ou retrouvé chez les patients CF (Chu *et al.* 1991). Il existe une relation inverse entre la longueur du tract de thymidine (T) situé dans l'intron 9 et la proportion de transcrits dépourvus de l'exon 10. En effet, la machinerie d'épissage reconnaît moins bien l'allèle T₅ que les allèles T₇ et T₉ (Chu *et al.* 1993). De plus, la répétition de dinucléotides (TG)_n adjacents au tract de poly T, module le saut de l'exon induit par la séquence poly T (Niksic *et al.* 1999; pour revue : Claustres 2005). L'identification des variants alléliques T₃ et T₂ confirme cette relation (Disset *et al.* 2005, Radpour *et al.* 2009). Des travaux additionnels ont mis en évidence que le recrutement des facteurs d'épissage TDP-43 et hnRNPA1/A2 au niveau de la répétition (TG)_n participe au saut de l'exon 10 (Buratti *et al.* 2001, Buratti *et al.* 2005, Ayala *et al.* 2006).

Le saut de l'exon 13. Il est décrit que des mutations exoniques (p.Asp565Gly, p.Gly576Ala) au niveau de séquences CERES (Composite Exonic Regulatory Element of Splicing), entraînent le saut de l'exon 13 (Pagani *et al.* 2003).

Exemple de pseudoexons du gène CFTR. Sur le gène *CFTR*, les mutations c.1680-886A>G (1811+1,6kb A>G) et c.3718-2477C>T (3849 +10kb C>T) induisent l'inclusion d'un exon cryptique de 49 et 84 pb, en créant un nouveau site donneur dans les introns 12 et 22, respectivement (Chillón *et al.* 1995, Highsmith *et al.* 1994). La mutation c.3140-26A>G (3272-26 A>G) crée un nouveau site accepteur dans l'intron 19 et entraîne l'insertion d'un exon cryptique de 25 pb. D'autre part, la délétion c.1002-1110_1113delTAAG crée un motif de reconnaissance pour la protéine SRP75, ce qui entraîne l'inclusion d'un pseudoexon de 101 pb dans l'intron 7 (Faà *et al.* 2009).

Site accepteur de type NAGNAG.

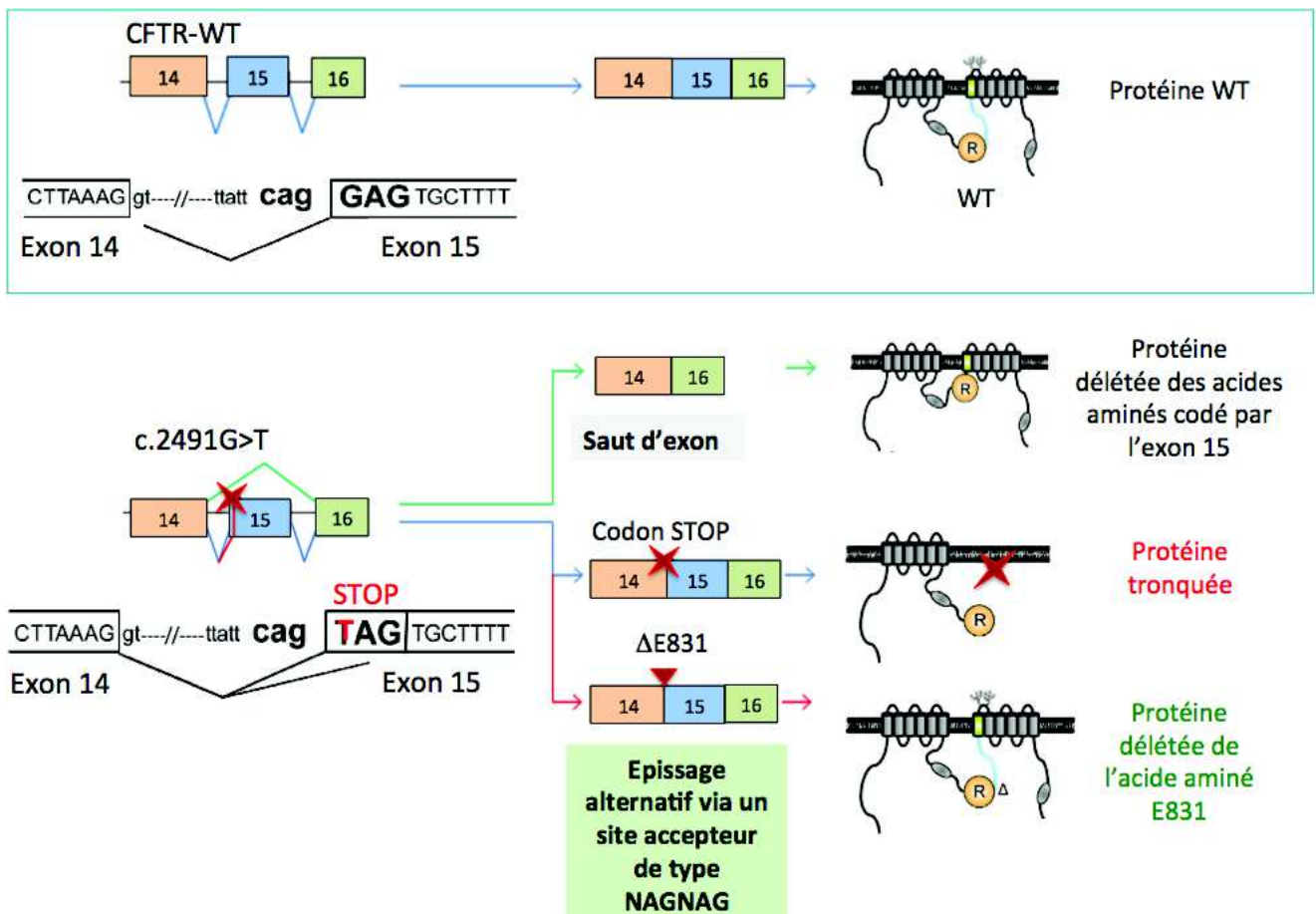


Figure 25 : Site accepteur de type NANAG dans l'exon 15 du gène *CFTR*.
(Adapté de Hinzpeter *et al.* 2010)

La mutation c.2491G>T qui entraîne la modification de l'acide glutamique 831 par un codon stop n'est pas associée à un phénotype sévère, lorsqu'elle est présente à l'état homozygote ou à l'état hétérozygote associée à une mutation sévère. Cette substitution, qui se trouve au niveau d'un site accepteur de type NAGNAG (**figure 25**), permet un épissage alternatif et ainsi la présence de 3 populations de transcrits : un transcrit délété de la totalité de l'exon 15, un transcrit contenant un codon stop et un transcrit alternatif délété de 3 nucléotides générant une protéine fonctionnelle grâce à l'utilisation de ce site NANAG (Hinzpeter *et al.* 2010).

2.2.2. La région 5'UTR du transcrit *CFTR* et les uORF

Les uORF (*upstream Open Reading Frames*) sont des petites séquences contenant un codon d'initiation et de terminaison, situés en amont et en phase avec l'ORF principal d'un gène. Ces séquences permettent la production de petits peptides. Il est estimé que 49% du transcriptome humain contient des uORF et leur mécanisme d'action est illustré sur la **figure 26** (Barbosa *et al.* 2013).

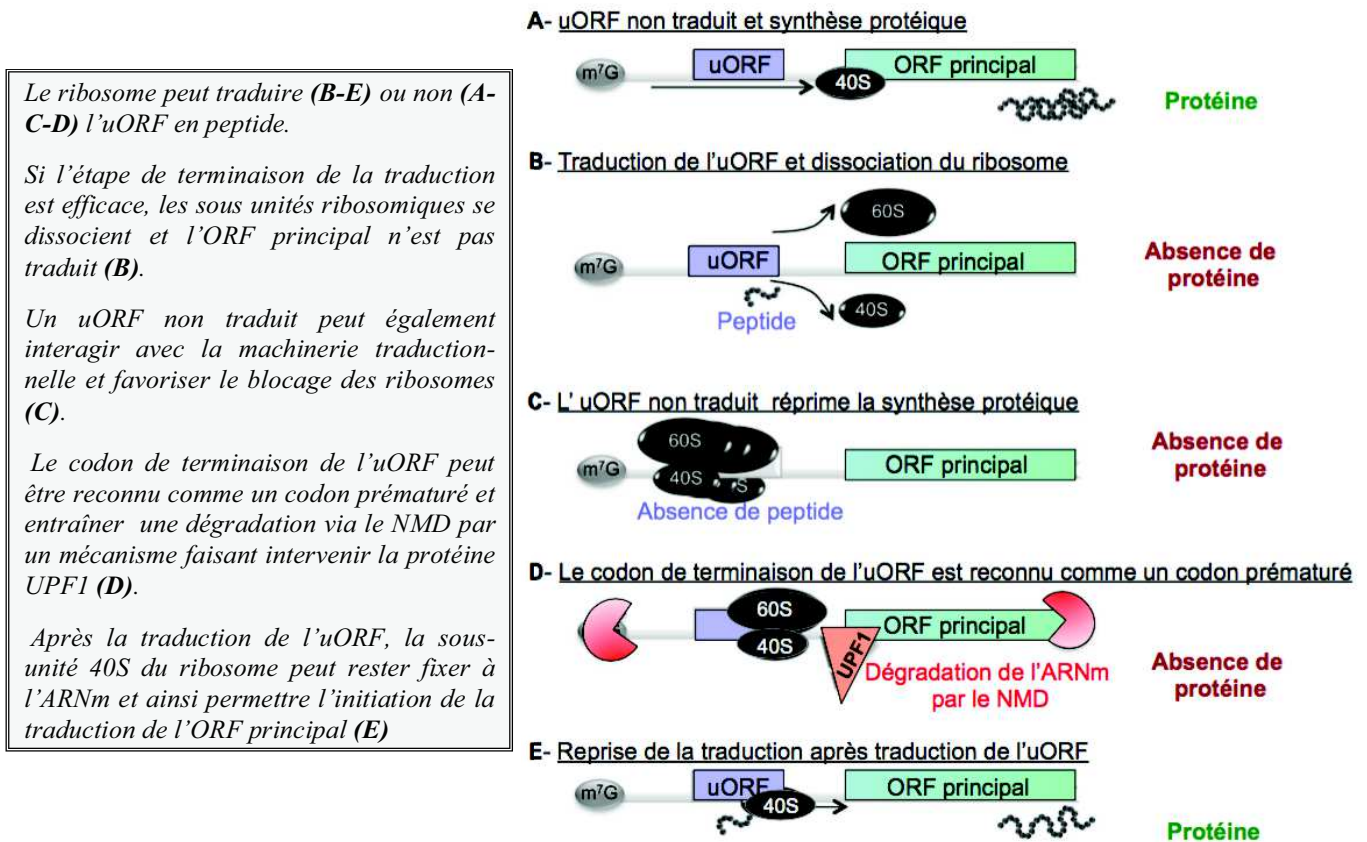


Figure 26 : Principaux mécanismes d'action des uORFs.
 (Adapté de Barbosa *et al.* 2013)

L'étude d'un variant (c.-34C>T) identifié chez un patient atteint de broncheectasie, a montré que ce dernier induit la création d'un uORF qui chevauche l'ORF principal du gène *CFTR*. Dans des modèles cellulaires, les auteurs montrent que le variant abolie l'activité transcriptionnelle du promoteur *CFTR* (Lukowski *et al.* 2011).

Dans la séquence promotrice du gène *CFTR*, la présence d'un uORF associé à une structure en épingle à cheveux participe au maintien d'une faible expression du gène *CFTR* (Lukowski *et al.* 2015).

2.2.1. La région 3'UTR du transcrit *CFTR*

2.2.1.1. Les miARNs

Les miARNs sont des ARNs non codants qui participent à la répression de l'expression des gènes en se fixant sur la région 3'UTR des transcrits. De nombreuses études montrent que ces régulateurs participent à la régulation post-transcriptionnelle du gène *CFTR* (Megiorni *et al.* 2011, Gillen *et al.* 2011, Hassan *et al.* 2012, Oglesby *et al.* 2013)

L'importance des miARNs dans la régulation physiologique ou pathologique du gène *CFTR* est davantage développée dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

2.2.1.2. Introduction aux motifs ARE et ARE-BPs

Les motifs ARE (AU-rich elements). Les AREs sont présents chez les transcrits ayant une faible stabilité, permettant ainsi une modification rapide du panel protéique cellulaire. Par exemple, les motifs ARE sont retrouvés dans la région 3'UTR de transcrits codant des cytokines, des molécules intracellulaires indispensables à la communication cellulaire, qui doivent être produites et dégradées très rapidement en réponse à des stimuli externes (Vlasova-St Louis & Bohjanen 2014). Les AREs sont des séquences riches en adénosines et uridines. Elles sont le site de fixation de protéines nommées ARE-BP (*pour ARE-binding protein*) qui modulent la stabilité des transcrits (Barreau *et al.* 2005). Les gènes contenant des AREs représentent environ 11% des gènes humains présents sur la base de données Ensembl et seulement 2 et 5% des gènes murins (rat, souris) (Halees *et al.* 2008). Les ARNm contenant

ces séquences peuvent être classés en 3 catégories, selon la composition en AU du motif. La classe I regroupe des transcrits contenant 1 à 5 motifs AUUUA dispersés dans des régions riches en uridines. Dans cette catégorie se retrouve par exemple les ARNm *c-myc*, *c-fos* et *p21*. La classe II se caractérise par la présence d'au moins 2 motifs UUAUUUA(U/A)(U/A) chevauchants et se subdivise en différents groupes. Par exemple le groupe IIA comporte des transcrits ayant un motif (AUUU)₅A tel que les ARNm *GM-CSF* ou *TNF- α* , le groupe IIB des transcrits comportant une séquence (AUUU)₄A tel que l'ARNm *IFN- α* et le groupe IIC des transcrits portant le motif (A/U)(AUUU)₃A(A/U) tels que les ARNm *Cox-2* et *IFN- β* . Enfin, la classe III regroupe les transcrits ayant des régions riches en uridines sans motif AUUUA comme l'ARNm *c-jun*. (Barreau *et al.* 2005).

Les ARE-BP. Les protéines se fixant sur les motifs ARE peuvent participer à la déstabilisation d'un transcrit, notamment par des mécanismes dépendant de la déadénylation. Par exemple, la protéine TTP peut recruter des enzymes telles que la déadénylase CCR4 (CNOT6), l'enzyme de décoiffage DCP1 (DCP1B) ou encore la protéine RRP4 (EXOSC2) qui est une RNase appartenant à l'exosome. Cette dernière et d'autres déadénylases telle que PARN (Poly A specific ribonuclease) peuvent également être recrutés par la protéine KHSRP (KSRP), un autre exemple de ARE-BP déstabilisatrice (Garneau *et al.* 2007). Au contraire, il est décrit que certains facteurs tels que ELAVL1 (Hur) et ELAVL4 (Hud) stabilisent l'ARNm. Des protéines telles que hnRNPd (AUF1) peuvent avoir un rôle à la fois stabilisateur et déstabilisateur (Barreau *et al.* 2005).

2.2.1.3. Les éléments *cis*-régulateurs du gène *CFTR* de type ARE

Tout comme les transcrits des cytokines présentés dans les paragraphes précédents, l'ARNm *CFTR* contient dans sa région 3'UTR des motifs ARE. En effet, les 217 pb de la région 3' UTR *CFTR* présentent 2 motifs AUUUA impliqués dans la stabilisation du transcrit, tandis que les 136 pb suivantes comportent des répétitions C dans un région riche en uridines et est impliqué dans la déstabilisation de ce dernier (Baudouin-Legros *et al.* 2005).

2.2.1.4. Impact de la délétion du triplet nucléotidique CTT dans la stabilité du transcrit *CFTR*

La délétion du triplet CTT retrouvée chez les patients CF porteurs de la mutation p.Phe508del a également été associée à un transcrit instable. Bien que controversé, certains travaux montrent une diminution du transcrit *CFTR* muté chez les patients CF (**tableau 4**).

Modèle cellulaire	Expression de l'ARNm <i>CFTR</i> , techniques & remarques
Cultures primaires ALI de cellules issues des voies aériennes (Ramachandran <i>et al.</i> 2013)	Pas de différences d'expression entre CF non-CF (<i>RT q-PCR</i>) Etude réalisée à partir de 6 individus CF homozygotes p.Phe508del
Epithéliums des voies aériennes fraîchement dissociés (Ramachandran <i>et al.</i> 2013)	Pas de différences d'expression entre CF non-CF (<i>RT q-PCR</i>) Etude réalisée à partir de 5 individus CF homozygotes p.Phe508del
Brossages bronchiques (Oglesby <i>et al.</i> 2013)	Sous expression chez les CF (<i>RT q-PCR</i>) Etudes réalisées à partir de 14 individus CF dont 5 hétérozygotes et 9 homozygotes pour la mutation p.Phe508del
Lignées 16HBE14o- et CFBE41o- (Oglesby <i>et al.</i> 2013)	Sous expression dans la lignée CF (<i>RT q-PCR</i>)
Brossages nasaux (Megiorni <i>et al.</i> 2013)	Sous expression chez les CF (<i>RT q-PCR</i>) Etude réalisée à partir de 18 individus CF dont 11 homozygotes et 6 hétérozygotes pour la mutation p.Phe508del
Brossages nasaux (Sermet-Gaudelus <i>et al.</i> 2002)	Pas de différences d'expression (<i>RT-PCR</i>) Etude réalisée à partir de 23 Individus CF homozygotes p.Phe508del
Tissus bronchiques (Engelhardt <i>et al.</i> 1992)	Pas de différences d'expression (<i>Hybridation in situ</i>) Etude réalisée à partir de 4 individus CF homozygotes p.Phe508del, 1 individu hétérozygote p.Phe508del / p.Gly551Asp et 1 individu hétérozygote avec une mutation inconnue et une mutation dans l'intron 19
Brossages nasaux (Trapnell <i>et al.</i> 1991a)	Pas de différences d'expression (<i>RT-PCR et marquage avec des sondes spécifiques à l'allèle CFTR WT ou muté</i>) Etude réalisée à partir d'individus CF homozygotes (n=4) ou hétérozygotes (n=14) p.Phe508del

Tableau 4 : Expression du gène *CFTR* chez les patients CF porteurs de la mutation p.Phe508del.

2.2.1.5. Autres facteurs impactant la stabilité du transcrit *CFTR*

Des expériences de demi-vie ont décrit que la présence de cytokines et d'un stress oxydatif influencent la stabilité du transcrit *CFTR* (Cantin *et al.* 2006a, Nakamura *et al.* 1992, Baudouin-Legros *et al.* 2005), contrairement à l'activation de la réponse UPR (Bartoszewski *et al.* 2008a). Ces expériences sont résumées dans le **tableau 5**.

Modèle cellulaire & traitement	Demi-vie de l'ARNm <i>CFTR</i>	Conclusion de l'étude	Références
Calu-3	5,55 h	L'activation de la voie UPR n'influence pas la stabilité du transcrit <i>CFTR</i>	Bartoszewski <i>et al.</i> 2008b
Calu-3 + ALLN (activation UPR)	5,8 h		
Calu-3	12 h	IL-1 β stabilise le transcrit <i>CFTR</i>	Baudouin-Legros <i>et al.</i> 2005
Calu-3 + IL1 β (cytokine)	24 h		
HelaWT	3,5 h	La délétion du triplet CTT n'influence pas la stabilité du transcrit	Bartoszewski <i>et al.</i> 2010
HelaDF (délétion du triplet CTT)	4 h		
HT-29	18,7 h	Le TNF- α diminue la stabilité du transcrit	Nakamura <i>et al.</i> 1992
HT-29 + TNF α (cytokine)	12,2 h		
HT-29	16 h	Le TNF- α diminue la stabilité du transcrit	Baudouin-Legros <i>et al.</i> 2005
HT-29 + TNF α (cytokine)	9 h		
T84	8,5 h	Un stress oxydatif diminue la stabilité du transcrit	Cantin <i>et al.</i> 2006a
T84 + tBHQ (stress oxydatif)	3 h		
T84	5,5 h	IL1- β n'influence pas la stabilité du transcrit	Cafferata <i>et al.</i> 2000
T84 + IL1- β (cytokine)	7,5 h		

Tableau 5 : Impact des facteurs sur la stabilité des transcrits *CFTR* dans différentes lignées cellulaires

3. MIARNS ET MUCOVISCIDOSE

3.1. Introduction aux miARNs

Les miARNs sont des petits ARNs non codants simple brin d'environ 22 nucléotides qui participent à la régulation des gènes. Ces ARNs sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels le développement, la différenciation, la prolifération ou encore la mort cellulaire (Kim V.N. *et al.* 2009). Il est estimé que 60% du génome humain est régulé par des miARNs (Brown *et al.* 2014). Ces derniers sont présents chez les Chromalveolata, les Métazoaires, les Mycetozoaires, les Viridiplantae et les Virus. Chez l'homme, actuellement 1881 précurseurs (pré-miR) et 2588 miARNs matures sont décrits (source : miRBase, 2015). Leur localisation est très variable dans le génome. En effet, ils peuvent se situer dans des régions intergéniques ou intragéniques, au niveau d'exons ou d'introns de gènes codants ou non pour des protéines, de manière isolée ou en cluster (**figure 27**). Certains gènes de miARN peuvent se loger au sein d'autres gènes et remplacer un intron : ce sont les mirtrons (Kapinas & Delany 2011, Gama-Carvalho *et al.* 2014, Base de données miRStart).

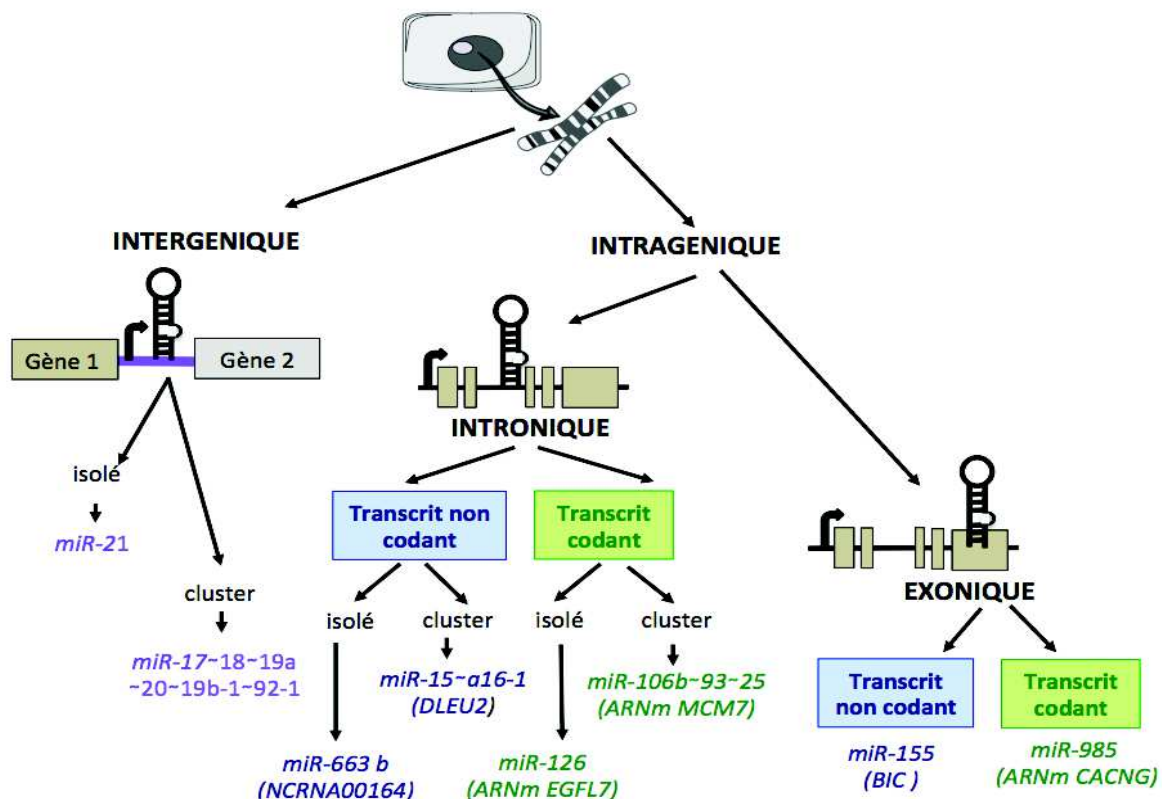


Figure 27 : Localisation des miARNs

3.1.1. L'historique sur les miARNs

Découverte de lin-4 et let-7 chez C.Elegans : Les miARNs sont des répresseurs post-transcriptionnels. Les miARNs ont été découverts pour la toute première fois en 1993 chez le nématode *C.Elegans*, un animal dont le développement passe par quatre stades larvaires avant d'atteindre le stade adulte. Il a été montré que le transcrite du gène *lin-14* était régulé par un autre ARN de très petite taille (22 nt) nommé *lin-4*. Ce dernier s'apparie de manière complémentaire à la région 3'UTR de l'ARNm *lin-14* et empêche son expression, permettant ainsi la transition du 1^{er} stade au 2nd stade larvaire (Lee *et al.* 1993, Wightman *et al.* 1993). Sept ans après la découverte de *lin-4*, un autre petit ARN de 21 nt nommé *let-7* impliqué dans la régulation du transcrite *lin-41* a été décrit. Ce miARN est indispensable pour le passage du stade larvaire au stade adulte (Reinhart *et al.* 2000).

Découverte des miARNs chez les vertébrés, invertébrés et les plantes (2001). La communauté scientifique découvre l'existence d'autres miARNs que *lin-4* et *let-7* chez *C.elegans* (Lee *et al.* 1993). De plus, ces petits ARNs sont également présents chez les plantes, les invertébrés (*Drosophila*) et les vertébrés (souris, zébrafish, humain) (Lau *et al.* 2001, Lagos-Quintana *et al.* 2001, Reinhart *et al.* 2002, Rhoades *et al.* 2002).

Implication des miARNs dans les cancers (2002). Les premiers travaux décrivant l'implication des miARNs dans les cancers ont été publiés sur les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC). La région chromosomique 13q14 contenant les gènes codant miR-15 et miR-16 est délétée dans 65% des LLC. Il en résulte donc une sous-expression de ces deux régulateurs. Une corrélation directe entre l'expression de miR-16 et sa cible RARS (Arginyl-tRNA synthetase) dans les cellules cancéreuses a été décrite (Calin *et al.* 2002).

Inhibition des miARNs in vivo chez la souris (2005). Une étude a montré pour la première fois l'extinction de l'expression d'un miARN *in vivo* chez des souris par une administration intraveineuse d'antagomiRs, des molécules qui piègent par complémentarité ces petits ARNs non codants (Krützfeldt *et al.* 2005).

Les miARNs peuvent activer la traduction (2007). L'ARNm du TNF- α comporte des motifs ARE (AU rich elements), qui lors d'une déplétion en sérum, permettent le recrutement du miR-369-3 qui a son tour recrute le complexe AGO2/FXR1 pour activer la traduction (Vasudevan *et al.* 2007).

Les miARNs peuvent agir sur la transcription (2008). MiR-373 qui présente des sites de fixation sur les promoteurs des gènes *CSDC2* (*Cold Shock Domain Containing Protein C2*) et de l'E-Cadhérine, en se fixant augmente le taux de leur ARNm endogène par le recrutement de l'ARN pol II (Place *et al.* 2008). Au contraire, certains miARNs en se fixant sur le promoteur de certains gènes, sont des répresseurs transcriptionnels. En effet, l'expression de miR-320 induit une diminution de l'ARNm *POLR3D* par le recrutement d'AGO1, EZH2 et H3K27me3, suggérant également l'implication de mécanismes épigénétiques (Kim *et al.* 2008).

3.1.2. La biogenèse et le mécanisme d'action des miARNs

De la transcription à la synthèse d'un précurseur. Le gène miARN peut utiliser pour sa transcription le promoteur du gène qui le loge ou avoir son propre promoteur. De manière générale, les miARNs présents sous la forme de clusters sont transcrits sous un ARN unique (Ha & Kim 2014). Tous comme les gènes codant des protéines, un gène miARN peut être transcrit par l'ARN polymérase II. Certains miARNs peuvent aussi être transcrits par l'ARN polymérase III, comme miR-517a qui est localisé au sein d'un cluster C19MC situé dans le chromosome 19 (Borchert *et al.* 2006). La transcription permet ainsi la synthèse d'une molécule nommée pri-miR qui sera clivée par un complexe multiprotéique nommé microprocesseur comportant deux protéines : DGCR8 (*pour DiGeorge Critical Region 8*) et la RNase III Drosha (voie canonique). Cette dernière possède deux domaines : RIIIDa et RIIIDb (*pour RNase III domains*) qui clivent respectivement l'extrémité 3' et 5' de la tige du pri-miR (Ha & Kim 2014). Toutefois, dans le cas d'un mirtron, cette étape est assurée par le spliceosome (voie non canonique) (Kim V.N. *et al.* 2009). Il en résulte une molécule ayant une structure d'épingle à cheveux, d'environ 70 nucléotides, nommée pré-miARN qui sera exportée vers le cytoplasme grâce à l'action de l'exportine 5, une protéine dépendante de ran-GTP. Cette première étape qui consiste à partir d'un gène de miARN à produire un précurseur peut être régulée par différents mécanismes comme illustré sur la **figure 28** (Winter *et al.* 2009, Ha & Kim 2014, Gama-Carvalho *et al.* 2014).

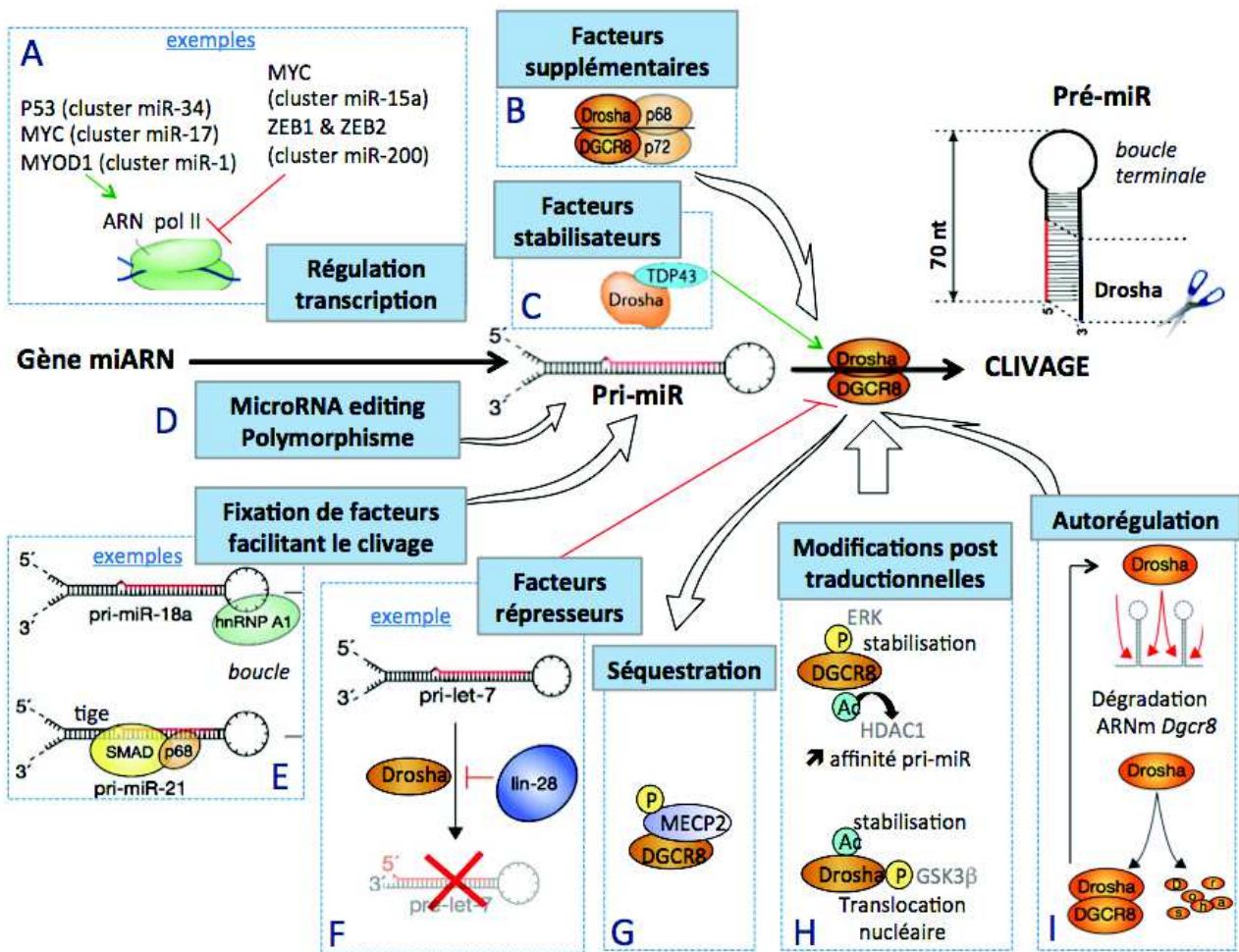


Figure 28 : Mécanismes de régulation de la biogenèse des miARNs dans le noyau (Adapté de Winter *et al.* 2009, Ha & Kim 2014 et Gama-Carvalho *et al.* 2014)

Figure 28-A : La transcription des gènes de miARN est régulée par des facteurs qui activent ou inhibent la transcription (ex : P53, MYC et MYOD1 activent la transcription des clusters miR-34, miR-17 et miR-1 tandis que les facteurs MYC, ZEB1 et ZEB2 inhibent la transcription des clusters miR-15a et miR-200). **Figure 28-B :** Le complexe Drosha/DGCR8 (microprocesseur) peut agir seul ou avec des facteurs associés (ex : p68 et p72) pour le clivage du pri-miR. **Figure 28-C&F :** Des facteurs répresseurs peuvent aussi inhiber l'action du complexe Drosha/DGCR8 (ex : lin-28 qui régule pri-let-7) ou le stabiliser pour augmenter son activité (ex : TDP43 stabilise Drosha). **Figure 28-H :** Les protéines du microprocesseur subissent des modifications post traductionnelles. La phosphorylation de Drosha par la protéine GSK3 β est indispensable pour sa localisation nucléaire et son acétylation empêche sa dégradation. La déacétylation de DGCR8 par la protéine HDAC1 augmente son affinité pour le pri-miR et sa phosphorylation par ERK, sa stabilité. **Figure 28-G :** DGCR8 peut également être séquestrée par la protéine MECP2 phosphorylée. **Figure 28-I :** Enfin, le complexe Drosha/DGCR8 s'autorégule. DGCR8 stabilise Drosha et en retour Drosha peut cliver l'ARNm Dgcr8. **Figure 28-D :** Le microRNA editing (déamination des adénosines en iosines par les protéines ADAR1 et ADAR2) peut empêcher le clivage du pri-miR qui est alors dégradé par la protéine Tudor-SN. Au contraire, ce mécanisme peut aussi favoriser l'action du microprocesseur. La présence d'un polymorphisme peut inhiber la formation du pré-miR. **Figure 28-E :** Au contraire, la présence de certains facteurs peut faciliter le clivage du pré-miR (ex : les protéines SMAD et p68 facilite la maturation du pre-miR-21 en se fixant sur sa tige et hnRNPA1 celle du pri-miR-18a en se fixant sur sa boucle).

De la synthèse du précurseur à l'action des miARNs matures. Dans le cytoplasme, le complexe TRBP (*TAR RNA-binding protein*)/ Dicer se fixe au pré-miR. Le Dicer est une RNase III qui permet de cliver la boucle terminale du précurseur, donnant ainsi naissance à un duplexe ARN qui sera pris en charge par les protéines argonaute (AGO1-4) pour former le complexe pré-RISC (*RNA-induced silencing complex*). Au sein de ce complexe, seul le brin complémentaire à l'ARNm (brin guide) est conservé, permettant ensuite de former le complexe RISC mature (Ha & Kim 2014, Li & Rana 2014). Les étapes qui permettent la formation d'un miARN mature à partir d'un précurseur sont finement régulées comme illustré sur la **figure 29**.

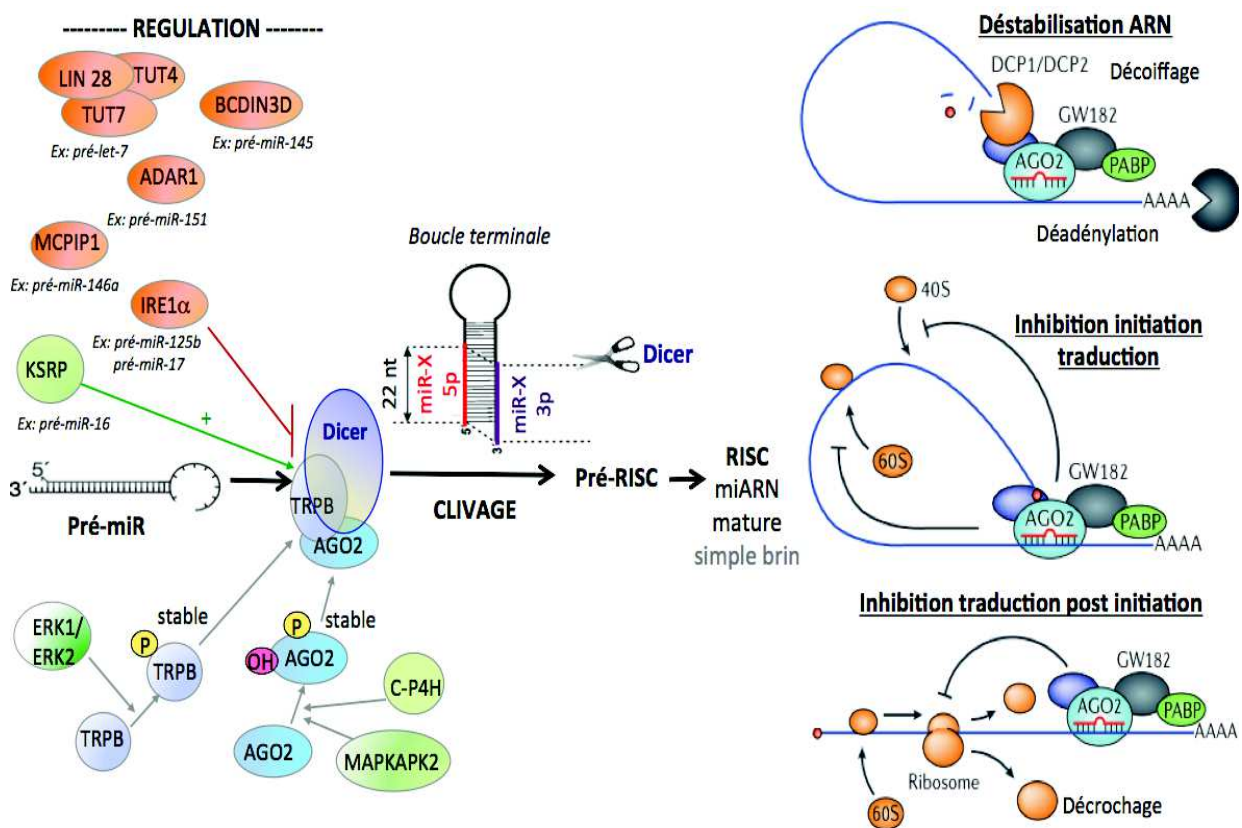


Figure 29 : Mécanisme de régulation des miARNs : du précurseur au miARN mature (Adapté de Li & Rana 2014 et Ha & Kim 2014)

Des facteurs peuvent se fixer sur le pré-miR pour faciliter sa maturation (ex : KSRP qui se fixe sur la boucle terminale). Des facteurs peuvent également inhiber l'action du Dicer. (ex : LIN28 peut permettre le recrutement de TUTases qui ajoutent des uridines à l'extrémité 3' des transcrits entraînant ainsi leur dégradation. Une méthylation par la protéine BCDIN3D, un RNA editing par l'enzyme ADAR1 ou une déstabilisation du transcrite par les protéines MCPIP1 et IRE1α peut aussi empêcher ce mécanisme). De plus, les protéines TRP et Ago2 nécessitent des modifications post-traductionnelles. Pour être stable, la protéine TRP doit être phosphorylée par les protéines ERK1 ou ERK2. La protéine AGO2, quant à elle doit être hydroxylée par la protéine C-P4H et phosphorylée par la phosphatase MAPKAPK2. Une fois le complexe RISC mature, ce dernier peut réprimer l'expression des gènes en déstabilisant les transcrits ou en empêchant la synthèse de la protéine.

Le miARN mature s'apparie avec l'ARNm cible par une séquence de reconnaissance nommée séquence "seed", située à son extrémité 5' (nucléotides 2 à 8) ainsi qu'avec les nucléotides situés en position 12 à 15 (Ha & Kim 2014). Les miARNs répriment l'expression des gènes en déstabilisation l'ARNm (mécanisme d'action dominant chez les cellules de mammifères) ou en inhibant la traduction (initiation ou post-initiation), entraînant ainsi leur dégradation. En effet, le complexe RISC empêche la reconnaissance de la coiffe par le complexe EIF4F, le recrutement des sous unités ribosomales 40S et 60S ainsi que la formation du complexe ribosomal 80S. Il peut également inhiber l'élongation des ribosomes entraînant ainsi leur décrochage et/ou faciliter la dégradation des peptides nouvellement synthétisés. Ce complexe peut aussi entraîner la déstabilisation des transcrits par le recrutement d'enzymes de décoiffage ou de déadénylation.

Les mécanismes de dégradations impliquent les P-bodies, des organelles riches en enzymes où les transcrits cibles sont dégradés ou stockés pour être à nouveau traduits en cas de stress (Li & Rana 2014). En plus de la biogenèse des miARNs et de ses mécanismes de régulation, s'ajoute un contrôle au niveau de l'action des miARNs puisqu'un gène peut être régulé par une multitude de miARNs et à l'inverse un miARN peut avoir un très grand nombre de transcrits cibles.

3.2. La régulation post transcriptionnelle du gène *CFTR* par les miARNs

Depuis 2011, différents travaux ont montré un rôle des miARNs dans la régulation du gène *CFTR*. Les expériences réalisées dans les différents modèles cellulaires sont répertoriées en annexe (II miARNs agissant sur l'expression du gène *CFTR*).

3.2.1. L'action directe des miARNs sur le transcrit *CFTR*

Une action des miARNs miR-101, miR144 et miR-494 sur la région 3'UTR *CFTR* a été décrite dans le modèle HEK-293 (Megiorni *et al.* 2011, Hassan *et al.* 2012). Dans les modèles PANC-1, 16HBE14o- et Caco-2, une action similaire de miR-494 a également été démontrée. Par contre, miR-101 ne semble pas agir dans le modèle colique (Gillen *et al.* 2011). Ces résultats suggèrent que certains miARNs pourraient agir spécifiquement selon les cellules utilisées. De plus, il a été mis en évidence dans le modèle bronchique 16HBE14o-

que le taux de miR-101 et miR-144 qui diminue la quantité de protéines CFTR endogène, peut être augmenté par le cadmium et la cigarette (Hassan *et al.* 2012). Ces observations sont particulièrement intéressantes, puisqu'il a été précédemment décrit que l'administration de ces toxiques diminuent le taux d'ARNm *CFTR* (Rennolds *et al.* 2010, Cantin *et al.* 2006b). De plus, une diminution de la quantité de protéine CFTR ainsi qu'une augmentation de miR-101 sont retrouvés dans des tissus pulmonaires de souris exposées à la cigarette, suggérant que miR-101 réprime l'expression du gène *CFTR* chez les fumeurs (Hassan *et al.* 2012).

D'autre part, l'étude du variant c.*1043A>C identifié chez un patient ABCD, a permis de réaliser des études fonctionnelles sur miR-509-3p (Amato *et al.* 2013). Cette substitution est localisée dans la région 3'UTR *CFTR*, au niveau d'un motif de fixation pour miR-433 et miR-509-3p. Le variant diminue l'affinité de miR-433 et augmente significativement celle de miR-509-3p. Dans la lignée pancréatique PANC-1, l'action directe de miR-509-3p a été validée par des expériences de gènes rapporteurs. Ce miARN diminue également le taux de protéines CFTR endogènes. L'action de miR-509-3p sur le transcrite *CFTR* est également décrite dans des modèles respiratoires (Ramachandran *et al.* 2013).

L'ensemble des miARNs agissant directement sur la région 3'UTR *CFTR* est représenté sur la

figure 30.

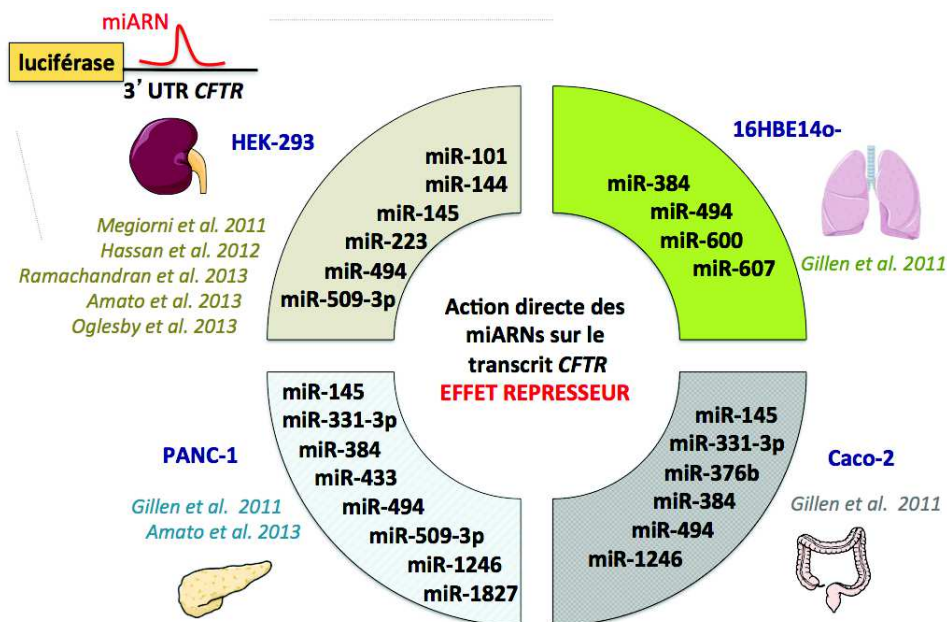


Figure 30 : Les miARNs qui se fixent sur la région 3'UTR *CFTR*

Données issues d'expériences de vecteurs rapporteurs dans le modèle rénal HEK-293, le modèle pancréatique PANC-1, le modèle colique Caco-2 et le modèle bronchique 16HBE14o-

3.2.2. L'action indirecte des miARNs sur le transcrit *CFTR*

Une étude récente a mis en évidence le rôle indirect de miR-138 sur des cultures primaires cultivées en interface air liquide (ALI) issues des voies respiratoires (trachée et bronches primaires). Ce miARN augmente la transcription du gène *CFTR* en inhibant le transcrit SIN3A qui code un facteur répresseur recruté sur le locus *CFTR* (DHS -20,9 kb). De plus, miR-138 améliore la biogenèse de la protéine CFTR mutante et restaure l'activité du canal (Ramachandran *et al.* 2012).

L'inhibition du taux de HSP90, CASR, HDAC7, SLC26A9, HDAC6 et AHSA1 restaure une protéine p.Phe508del fonctionnelle. En recherchant des miARNs ciblant ces gènes, une équipe a identifié miR-1, miR-16 et miR-302a. Dans le modèle pancréatique CFPAC, ces 3 miARNs augmentent l'expression de l'ARNm *CFTR* et le taux de protéines CFTR mais n'impactent pas la demi-vie du transcrit, suggérant ainsi un rôle indirect de ces miARNs. Sur des cultures bronchiques CF en ALI, l'introduction de miR-16 induit une diminution du taux de protéine HSP90 endogène et une augmentation de l'activité du canal CFTR. L'activité de la protéine CFTR est également restaurée par miR-302a (Kumar *et al.* 2015).

3.1. Les miARNs dans la mucoviscidose

3.1.1. Introduction des miARNs dans les pathologies

Les miARNs régulent de nombreuses voies de signalisation et de ce fait, ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies tels que les cancers (Di Leva & Croce 2013), les maladies du métabolisme, les maladies cardiaques, les maladies inflammatoires ou encore les infections virales (Van Rooij, Purcell *et al.* 2012). Au niveau de l'appareil respiratoire une dérégulation de l'expression de ces petits ARNs non codants a été mis en évidence dans les maladies pulmonaires dont les *broncho-pneumopathies chroniques obstructives* (BPCO), les fibroses pulmonaires idiopathiques, l'asthme, les lésions pulmonaires aiguës, les cancers, l'hypercapnie et l'hypertension pulmonaire artérielle (HTA), mais également chez les fumeurs (Schembri *et al.* 2009, Angulo *et al.* 2012, Sessa & Hata 2014, Brown *et al.* 2014). Certaines de ces dérégulations sont représentées sur la **figure 31**. Les miARNs peuvent également être

des biomarqueurs qui peuvent être étudiés de manière non invasive, à partir du sang, de la salive ou encore des urines. Des études ont montrés que les miARNs circulants sont stables (Chen *et al.* 2008, Mitchell *et al.* 2008, Xie *et al.* 2010). De plus, certains miARNs exprimés dans les crachats sont des marqueurs d'adénocarcinomes pulmonaires (Yu *et al.* 2010).

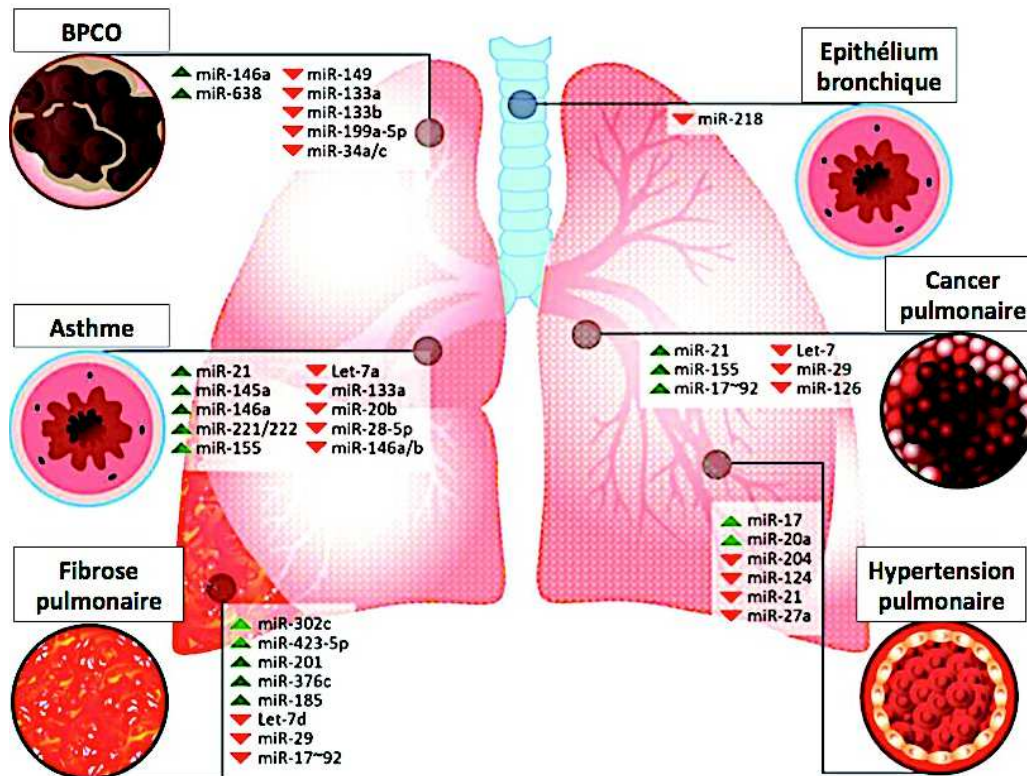


Figure 31 : miARNs dérégulés dans les pathologies respiratoires.
(Adapté de Brown 2015)

Les auteurs ont indiqué la surexpression par un triangle vert ▲ et la sous expression par un triangle rouge ▼.

3.1.2. Les miARNs dérégulés dans les modèles CF en comparaison avec les modèles non-CF

Actuellement, l'étude des miARNs dans la mucoviscidose a été réalisée à partir de différents modèles cellulaires.

Dérégulation de miARNs impliqués dans l'expression du gène CFTR. miR-145, miR-223 et miR-494 sont surexprimés dans des cellules CFBE41o- comparées aux cellules 16HBE14o-. Des résultats similaires ont été observés entre des prélèvements issus de brossages bronchiques de patients CF et d'individus contrôles (Oglesby *et al.* 2013). Une surexpression de miR-145 est également décrite dans les brossages nasaux CF (Megiorni *et*

al. 2013). De plus, miR-509-3p et miR-138 sont surexprimés dans des cultures primaires ALI issues des voies respiratoires (incluant la trachée et les bronches primaires) d'individus CF, (Ramachandran *et al.* 2012, Ramachandran *et al.* 2013). L'action de ces miARNs est résumée sur la **figure 32**.

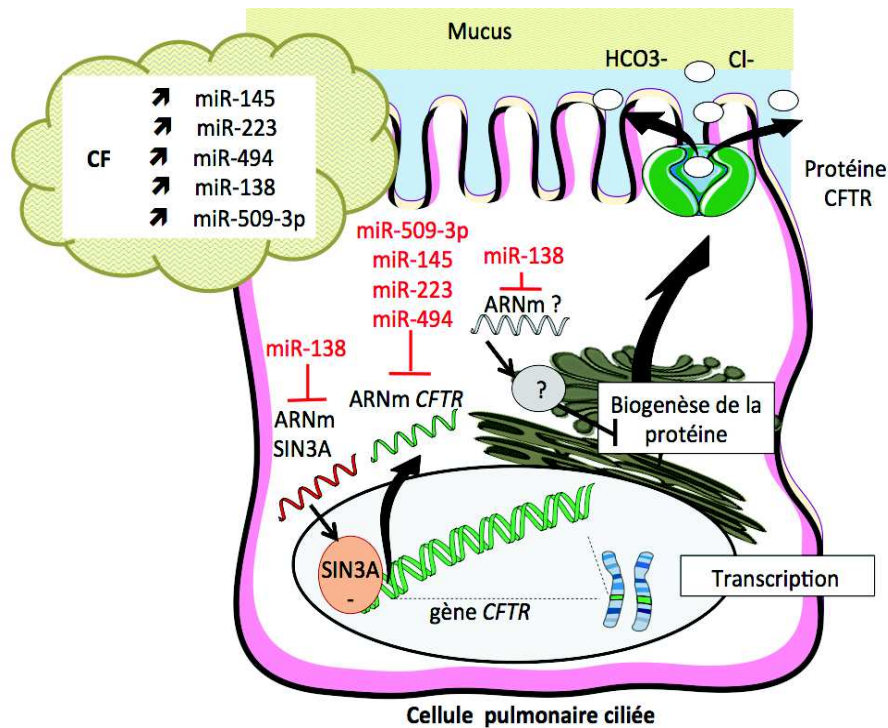


Figure 32 : Dérégulation des miARNs impactant l'expression du transcrit *CFTR*

Lien entre dérégulation de miARNs, expression du gène CFTR et inflammation. Des travaux réalisés sur des cultures ALI issues des voies respiratoires (individus non-CF) et des cellules Calu-3 ont montré que le TNF- α et l'IL-1 β , *via* la voie NF- κ B, entraînent une inhibition du transcrit *CFTR* par l'augmentation de miR-494 et 509-3p (Ramachandran *et al.* 2013).

Dérégulation de miARNs impliqués dans l'inflammation. miR-155 est surexprimé dans 3 modèles CF (*cellules IB3-ICF versus cellules IB3-1/S9; brossages bronchiques CF versus non-CF et neutrophiles CD66+ CF versus non-CF*). Dans le modèle IB3, la surexpression de miR-155 est liée au défaut d'activité du canal CFTR (démonstré *via* l'utilisation de l'inhibiteur 172) et entraîne la répression de SHIP1 (*Inositol polyphosphate-5-phosphatase*), l'activation de la voie PI3K/Akt et par conséquent une augmentation du taux d'IL-8 (Bhattacharyya *et al.* 2011) (**figure 33**).

D'autre part, la comparaison de brossages bronchiques CF avec des échantillons contrôles, ou de cellules CFBE41o- avec des cellules 16HBE14o-, a permis de mettre en évidence une sous-expression de miR-126 dans les cellules CF. Ce miARN réprime l'expression du transcrite TOM1 dont la protéine inhibe l'activation de la voie NF-κB induite par le LPS ou l'IL-1β. Ainsi la sous-expression de miR-126 induit une diminution du taux l'IL-8. De plus, les auteurs ont mis en évidence que la dérégulation de miR-126 est induite par un stress du réticulum après un traitement à la thapsigargine (Oglesby *et al.* 2010) (**figure 33**).

Les miARNs miR-126 et miR-155 modulent la production d'IL-8 de manière indirecte. De récents travaux ont mis en évidence l'action directe de miR-17 sur la région 3'UTR de l'IL-8 (**figure 33**). Le miARN miR-17 est retrouvé sous exprimé dans les brossages bronchiques CF. Sa dérégulation est elle même liée au contexte inflammatoire puisque miR-17 est sous exprimé dans les tissus respiratoires de souris βENaC-Tg (phénotype inflammatoire) contrairement au souris Cfr^{-/-} ainsi que dans les cellules CF bronchiques adultes (brossages) contrairement aux cultures primaires bronchiques CF pédiatriques.

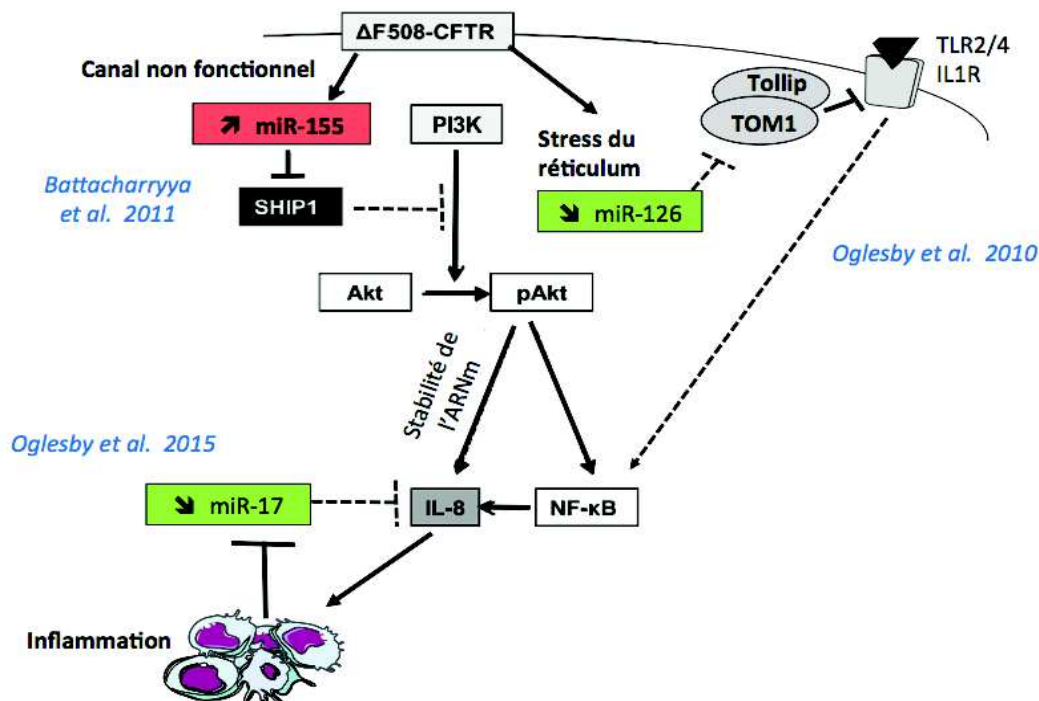


Figure 33 : miARNs dérégulés dans les modèles CF impliqués dans l'inflammation (Adapté à partir des travaux d'Oglesby *et al.* 2010, Battacharryya *et al.* 2011 et Oglesby *et al.* 2015a)

Ce schéma est une synthèse réalisée à partir des résultats obtenus dans les lignées IB3-1 CF et CFBE41o-.

D'autre part, miR-31 qui réprime l'expression du transcrit *CTSS* est sous exprimé dans 4 modèles CF (*brossages bronchiques, cultures primaires ALI bronchiques, lignées CFBE410- vs 16HBE14o-, lignées CFTE29o- vs 9HTE0-*). Ainsi, la dérégulation de ce miARN chez les CF augmente le taux de cathépsine S (CTSS), une protéine qui contribue à l'inflammation en dégradant les protéines antimicrobiennes telles que la lactoferrine ou encore la β -défensine (Weldon *et al.* 2014).

De manière intéressante, des miRNomes réalisés sur des cultures bronchiques (non-CF) en ALI, ont montré que l'expression de miR-17 et miR-31 diminue au cours de la différenciation cellulaire (Marcet *et al.* 2011).

Enfin, la surexpression de miR-145 dans les brossages nasaux corrèle avec une diminution du taux de transcrits SMAD3, un gène régulé par ce miARN. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse que la diminution de SMAD3 participerait au phénotype pro-inflammatoire observée dans les voies respiratoires des patients CF (Megiorni *et al.* 2013). Cette hypothèse s'appuie sur les travaux d'une autre équipe qui a montré que la voie du TGF- β 1 (dans laquelle le facteur SMAD3 est impliqué) jouerait un rôle dans l'inhibition de la voie NF- κ B/IL-8, dans les cultures primaires bronchiques (Ge *et al.* 2010).

Dérégulation des miARNs et réponse UPR (Unfolding Protein Response). La surexpression de miR-145, miR-494 et miR-221 dans des brossages bronchiques de patients CF comparé à des individus non-CF ainsi que dans la lignée CFBE41o- comparé aux cellules 16HBE14o-, corrèle avec une diminution du taux de transcrits *ATF6* endogène, un facteur impliqué dans la réponse UPR. Des études fonctionnelles ont montré que l'ARNm *ATF6* est une cible directe de ces miARNs (Oglesby *et al.* 2015b). Ces données sont intéressantes car une étude a montré que le stress du réticulum entraîne la fixation du facteur ATF6 au niveau du promoteur minimal du gène *CFTR*, ce qui participe à l'inhibition de la transcription (Bartoszewski *et al.* 2008b).

3.1.3. La dérégulation des miARNs dans des mécanismes liés à la mucoviscidose

Dérégulation des miARNs au cours d'une infection par Pseudomonas aeruginosa. La sous-expression de miR-93, un miARN qui réprime l'expression du transcrit *IL-8*, a également été mise en évidence dans les modèles IB3-1, CuFi-1 et NuLi-1 lors d'une infection par *Pseudomonas aeruginosa* (PAO). Cette bactérie augmente le taux d'*IL-8* par deux mécanismes (**figure 34**) : en augmentant l'activité du facteur NF- κ B et en diminuant le taux des protéines E2F-1 et Myc, des facteurs de transcription du gène *MCM7*. Le gène *hsa-miR-93* loge au sein d'un intron du gène *MCM7* et sa transcription est dépendante de ce dernier. Ainsi la diminution des facteurs E2F-1 et Myc diminue le taux de miR-93 et augmente la quantité d'*IL-8* (Fabbri *et al.* 2014)

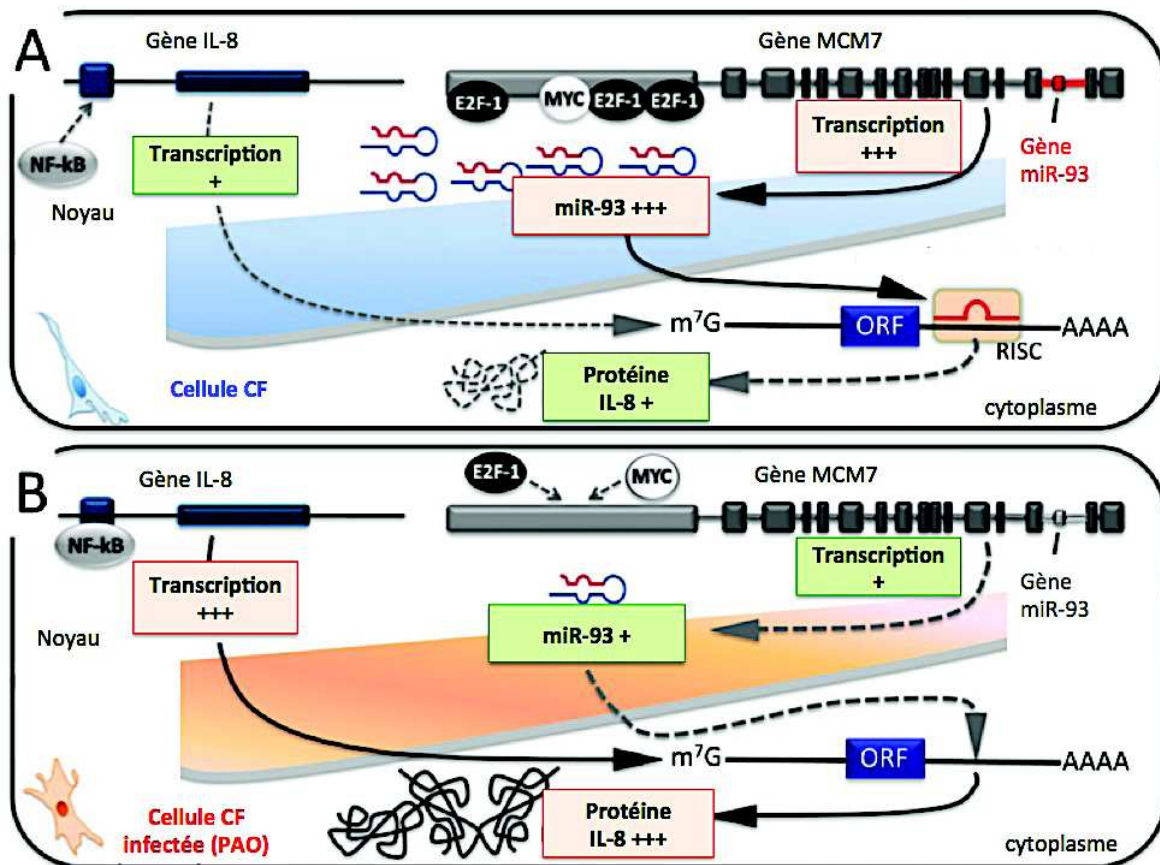


Figure 34 : Rôle de miR-93 dans les cellules bronchiques CF infectées par *Pseudomonas aeruginosa*.

(Adapté de Fabbri *et al.* 2014)

A : Cellule CF non infectée, B : Cellule CF infectée par *Pseudomonas aeruginosa*

Stimulation des macrophages par le LPS. Il a été montré que dans un modèle de macrophages murins CF (issu de souris *Cftr*^{-/-}) stimulé au LPS, contrairement aux cellules non-CF, le taux de miR-199-5p augmente suite à un défaut d'activation de la voie PI3K/Akt. Cette augmentation entraîne une répression de la calvéoline qui est la cible directe de miR-199-5p et par conséquent, l'absence d'un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation induite par TLR4. Ce mécanisme participerait à l'hyper-inflammation dans les macrophages. Les auteurs ont également montré que l'utilisation d'un traitement tel que le Celecoxib stimulait la voie AKT/miR-119a-5p/CAV1 dans les macrophages CF humain, diminuant ainsi l'inflammation (Zhang P.X. *et al.* 2015)

3.1.4. Les miARNs : de nouvelles cibles pour contrôler l'expression des gènes.

3.1.4.1. **Introduction aux antimiRs**

Propriétés des antimiRs. L'action des miARNs matures peut être inhibée par la surexpression d'ARNs leurres contenant des sites de fixation pour le miARN d'intérêt (miRNAs '*sponge*') ou par des oligonucléotides antisens (Van Rooij & Kauppinen 2014). L'efficacité des oligonucléotides pour inhiber l'action des miARNs a d'abord été montrée dans le modèle *Drosophile* par l'utilisation de molécules ADN simple brin (Boutla *et al.* 2003). Une des stratégies développées ensuite pour résister aux nucléases a été de remplacer l'atome d'oxygène présent dans les liaisons phosphodiester par un atome de soufre pour former ainsi une liaison phosphorotioate. Ces modifications favorisent également la fixation des protéines plasmatiques, ce qui réduit la clairance des antimiRs par la filtration glomérulaire et ainsi leur élimination par les urines, favorisant ainsi leur distribution dans les tissus. Afin d'augmenter la stabilité et l'efficacité des antimiRs (appariement aux ARNs cibles), différentes modifications chimiques au niveau du sucre (**figure 35**) ont également été apportées (modifications 2'O-méthyl = 2'O-Me ; 2'O-méthoxyéthyl = 2'O-MOE ; 2'-fluoro = 2'F ; locked nucleic acid = LNA).

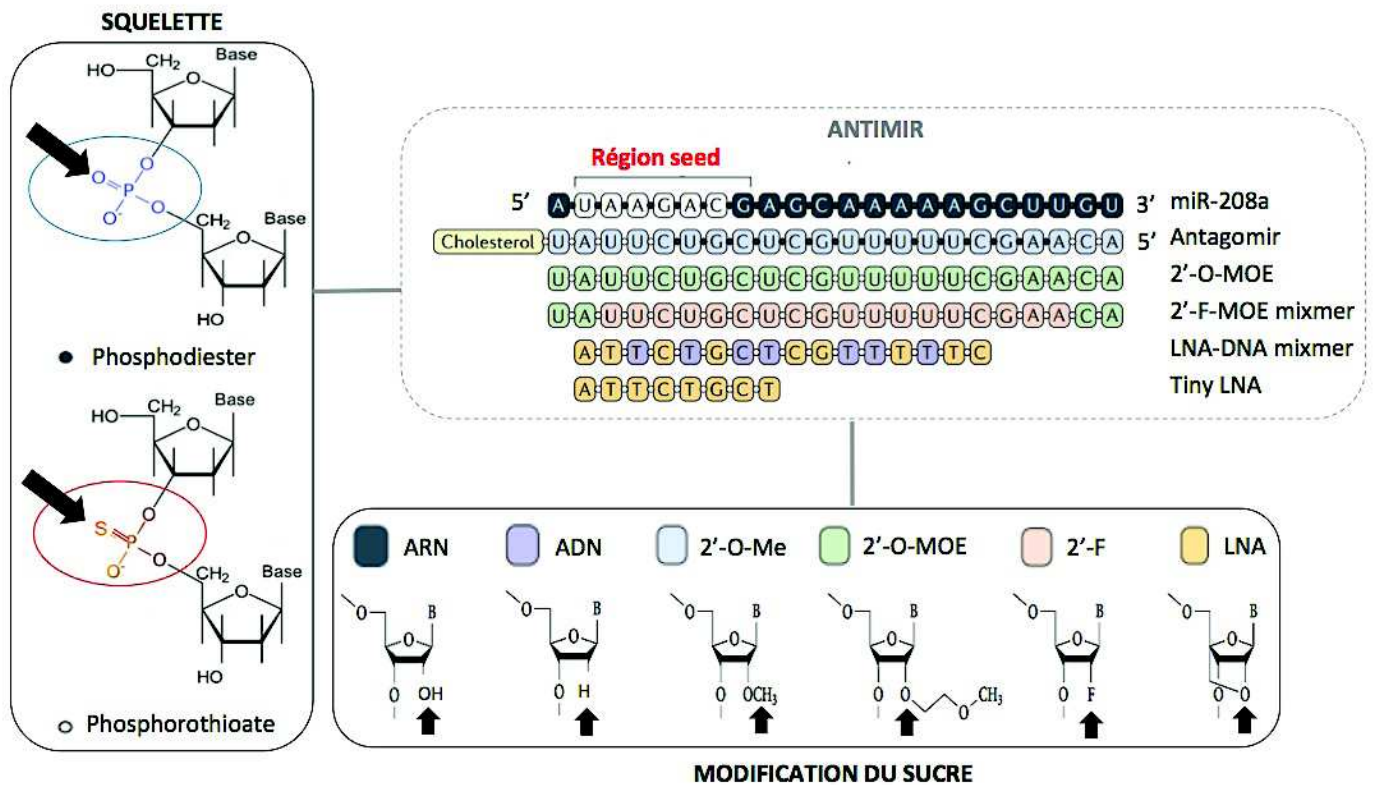


Figure 35 : Chimie des antimiRs couramment utilisés
(Adapté de van Rooij & Olson 2012)

Les cercles blancs représentent des groupements phosphodiester et les cercles noirs des groupements phosphorothioate. Chaque carré correspond à un nucléoside modifié ou non. Carré noir : ARN (acide ribonucléique); violet : ADN (acide désoxyribonucléique); bleu : 2'-O-Me (modification 2'-O-methyl); vert : 2'-O-MOE (modification 2'-O-methoxyethyl); orange : 2'-F (modification 2'-fluoro); jaune : LNA (modification locked nucleic acid)

De manière intéressante, ces modifications augmentent la température de fusion (T_m). En particulier, les antimiRs avec des modifications de type LNAs présentent une plus grande affinité pour leur cible ARN. D'autres antimiRs tels que les antagomiRs possèdent également un groupement cholestérol en plus des sucres modifiés (pour revue : Van Rooij & Olson 2012, Li & Rana 2014, Van Rooij & Kauppinen 2014).

Actuellement, différentes études précliniques sont en cours pour tester des antimiRs dirigés contre des miARNs impliqués dans diverses pathologies telles que les hépatocarcinomes (miR-221), les glioblastomes (miR-10b), les fibroses rénales (miR-21), l'athérosclérose (miR-33), les maladies myéloprolifératives (miR-451) ou encore les maladies cardiaques (miR-208). Deux études avancées, dirigées contre miR-122 impliqué dans la

réplication du virus de l'hépatite C, sont en cours (phase I, société Regulus Therapeutics; phase II, société Santaris Pharma) (Li & Rana 2014, van Rooij & Kauppinen 2014). L'étude de phase II utilise des antimiRs avec des modifications de type LNA. Ces travaux sont davantage détaillés dans le paragraphe suivant.

Les antimiRs : un outil thérapeutique. Les premières administrations d'antimiRs réalisées *in vivo* ont été effectuées par injection intraveineuse avec des antagomiRs (oligonucléotides antisens avec une molécules cholestérol et des modifications 2'-O-methyl), chez la souris. Les antagomiRs présentent une bonne biodistribution puisque ces molécules agissent dans divers organes (foie, reins, poumons, cœur, muscle squelettique, peau, glandes surrénales, ovaires, intestins) sans toxicité hépatique apparente. De plus, l'inhibition de miR-122 entraîne une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse du cholestérol (Krützfeldt *et al.* 2005). Des antimiRs avec des modifications LNA ont ensuite été administrés chez des souris par injection intrapéritonéale. Ces molécules sont plus efficaces (dose efficace médiane =10mg.kg⁻¹) que les antagomiRs (pas d'effet entre 1-25 mg/kg). Chez les primates (singes Africains verts), cette molécule diminue le taux de cholestérol plasmatique sans trace de toxicité hépatique et rénale (Elmén *et al.* 2008). Des chimpanzés infectés par le virus de l'hépatite C, ont ensuite été traités avec des antimiRs à modifications LNA dirigés contre miR-122. Grâce à cette approche, le virus qui doit utiliser le microRNA de la cellule hôte, ne peut plus se répliquer. Ainsi, ce traitement diminue la virémie. De plus, la molécule est bien tolérée au cours d'administrations prolongées (Landford *et al.* 2010). Ces résultats ont ensuite permis de tester la molécule sur des humains infectés par le virus (5 injections hebdomadaires sous-cutanées durant 29 jours). Les résultats de cet essai clinique de phase 2a indiquent que l'administration d'antimiRs à modifications LNA diminue la virémie et cela de manière dose dépendante (molécule testée à 3, 5 et 7mg/kg), sans signe de résistance du virus. De plus pour 5 patients traités, l'ARN du virus est devenu indétectable (Janssen *et al.* 2013).

3.1.4.2. L'inhibition de l'action des miARNs agissant sur le transcrit *CFTR*

Deux études décrivent que l'utilisation d'inhibiteur de miARNs (antimiRs) peut augmenter l'expression du gène *CFTR* endogène. Dans des cultures bronchiques CFBE41o-, l'inhibition de miR-145, miR-223 et miR-494 augmente le taux de transcrit *CFTR*. L'utilisation combinée d'antimiRs dirigés contre ces 3 miARNs augmente également l'activité du canal CFTR (Oglesby *et al.* 2013). Dans le modèle Calu-3 et dans des cultures primaires ALI issues de trachées ou de bronches, l'utilisation d'antimiRs dirigés contre miR-494 et miR-509-3p augmente à la fois le taux d'ARNm, le taux de protéines et l'activité du canal CFTR (Ramachandran *et al.* 2013). Toutefois, ces molécules ne sont pas spécifiques au transcrit *CFTR* et inhibent également l'action des miARNs sur leurs autres cibles que l'ARNm *CFTR*.

4. RÉSULTATS

4.1. Article 1 : Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis

4.1.1. Contexte de l'étude

L'expression du gène *CFTR* est fortement régulée au niveau tissulaire et au cours du développement. Bien que certains travaux montrent que l'implication d'éléments *cis*- et *trans*-régulateurs pourrait expliquer cette régulation particulière (McCarthy & Harris 2005, René et al. 2005, Taulan et al. 2007), aucune donnée actuellement ne permet de comprendre comment ce gène est réprimé dans les poumons matures.

Chez l'homme, au niveau pulmonaire, le transcrit *CFTR* est fortement exprimé durant la vie fœtale (Trezise et al. 1993, Tizzano et al. 1994). En particulier, un pic d'expression aux alentours de la 18^{ème} semaine d'aménorrhée est observé (Bergougnoux *et al.* 2014), puis ce taux diminue jusqu'à être réprimé à la naissance ou seulement quelques copies d'ARNm par cellule sont détectables (Trapnell *et al.* 1991a). Cette différence d'expression entre le poumon fœtal et le poumon mature a également été observée dans le modèle ovin (Broackes-Carter *et al.* 2002). En examinant la séquence promotrice, des outils de prédiction bioinformatiques ont prédit la présence de motifs de fixation pour les facteurs de transcription tels que les protéines C/EPB (Berg *et al.* 2006; Bassères *et al.* 2006), FOXA (Zhou *et al.* 1997), NKX-2 (DeFelice *et al.* 2003; Bohinski *et al.* 1994), FOXF1 et SOX17, essentielles dans le développement des tissus issus de l'endoderme (pour revue : Maeda *et al.* 2007). Toutefois, l'impact de ces facteurs sur l'expression du gène *CFTR* n'a jamais été évalué.

Une régulation au niveau des séquences *cis*-régulatrices localisées au niveau de la partie 3'UTR de ce gène a également été décrite (Baudouin-Legros *et al.* 2005). En parallèle de ce travail, d'autres équipes ont mis en évidence une modulation du taux de transcrit *CFTR* par les microARNs (Gillen *et al.* 2011; Hassan *et al.* 2012; Oglesby *et al.* 2013; Ramachandran *et al.* 2013). Comme tous régulateurs, ces petits ARNs non codants semblent présenter une tissu spécificité (Gillen *et al.* 2011) et une régulation temporelle (Dong *et al.* 2010). De plus, les miARNs peuvent avoir un rôle à des étapes très précoces du développement (Lu *et al.* 2012). Néanmoins, l'impact de ces régulateurs sur le transcrit *CFTR* n'a jamais été évalué dans des modèles issus de poumons fœtaux.

L'objectif du travail présenté consistait à :

→ Identifier les éléments régulateurs permettant d'expliquer la différence d'expression entre le stade fœtal et le stade adulte au niveau pulmonaire.

- Identifier et définir le rôle des facteurs de transcription se fixant sur le promoteur du gène *CFTR*.

- Identifier des motifs *cis*-régulateurs situés sur la région 3'UTR du transcrit *CFTR*.

- Définir l'impact des miARNs sur le taux de transcrits *CFTR*.

→ Développer des outils permettant de bloquer l'action des répresseurs identifiés et évaluer leur impact sur le taux de transcrit *CFTR*.

→ Tester ces outils sur des modèles *ex-vivo* issus de patients CF.

4.1.2. Publication



Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult *CFTR* expression change are new targets for cystic fibrosis

Victoria Viart^{1,2,3}, Anne Bergougnoux^{1,3}, Jennifer Bonini^{1,2}, Jessica Varilh^{1,3}, Raphaël Chiron⁴, Olivier Tabary^{5,6}, Nicolas Molinari^{7,8}, Mireille Claustres^{1,2,3} and Magali Taulan-Cadars^{1,2}

Affiliations: ¹INSERM U827, Laboratoire de Génétique de Maladies Rares, Montpellier, France. ²Université Montpellier I, UFR de Médecine, Montpellier, France. ³Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Montpellier, Montpellier, France. ⁴Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), CHU Montpellier, Montpellier, France. ⁵CDR St Antoine, INSERM UMR-S 938, Paris, France. ⁶UPMC Université Paris 06, Paris, France. ⁷Département d'Information Médicale, CHU Montpellier, Montpellier, France. ⁸UMR 729 MISTEA, Université Montpellier I, Montpellier, France.

Correspondence: Magali Taulan-Cadars, INSERM U827, Laboratoire de Génétique de Maladies Rares, Montpellier, France. E-mail: magali.taulan@inserm.fr

ABSTRACT The *CFTR* gene displays a tightly regulated tissue-specific and temporal expression. Mutations in this gene cause cystic fibrosis (CF). In this study we wanted to identify *trans*-regulatory elements responsible for *CFTR* differential expression in fetal and adult lung, and to determine the importance of inhibitory motifs in the *CFTR*-3'UTR with the aim of developing new tools for the correction of disease-causing mutations within *CFTR*.

We show that lung development-specific transcription factors (FOXA, C/EBP) and microRNAs (miR-101, miR-145, miR-384) regulate the switch from strong fetal to very low *CFTR* expression after birth. By using miRNome profiling and gene reporter assays, we found that miR-101 and miR-145 are specifically upregulated in adult lung and that miR-101 directly acts on its cognate site in the *CFTR*-3'UTR in combination with an overlapping AU-rich element. We then designed miRNA-binding blocker oligonucleotides (MBBOs) to prevent binding of several miRNAs to the *CFTR*-3'UTR and tested them in primary human nasal epithelial cells from healthy individuals and CF patients carrying the p.Phe508del *CFTR* mutation. These MBBOs rescued *CFTR* channel activity by increasing *CFTR* mRNA and protein levels.

Our data offer new understanding of the control of the *CFTR* gene regulation and new putative correctors for cystic fibrosis.



@ERSpublications

Transcription factors/miRNAs that regulate fetal to adult *CFTR* expression change are new targets for CF treatment <http://ow.ly/zEgYQ>

This article has online supplementary material available from erj.ersjournals.com

Received: May 19 2014 | Accepted after revision: July 07 2014

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside the online version of this article at erj.ersjournals.com

Copyright ©ERS 2014

Introduction

Most transcription factors are part of multi-protein complexes that recruit other transcription factors and cofactors to mediate local and long-range chromatin changes through physical modifications [1]. Within the transcriptional and post-transcriptional *trans*-regulatory elements that make up gene regulatory networks, transcription factors often interact with microRNAs (miRNAs) to control gene expression [2, 3]. miRNAs are post-transcriptional regulators that are expressed in a tissue-specific or developmental stage-specific manner, thereby greatly contributing to cell/tissue-specific protein expression profiles, including during lung organogenesis [4, 5].

Mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*; MIM# 602421) gene are responsible for cystic fibrosis (MIM# 219700), a common recessive lethal disorder. Chronic lung disease is the major cause of mortality and morbidity in patients with cystic fibrosis. *CFTR* gene expression is spatially and temporally regulated and several studies have demonstrated the differential use of transcription start sites, depending on the tissue type or the developmental stage [6–9]. In the lung, *CFTR* transcripts can be detected early during embryo development (12th week of pregnancy) and their level progressively increases up to the 24th week of pregnancy. Thereafter, *CFTR* expression in the airways decreases and is repressed until after birth and remains very low during adult life [10–14]. The changes in *CFTR* protein expression in human fetuses are consistent with *CFTR* mRNA temporal pattern [14]. This developmental regulated expression suggests that *CFTR* is involved in lung organogenesis, possibly by participating in the mechanico-sensory process that is essential for the regulation of Wnt/ β -catenin signalling during lung development [15].

Several repressors and activators have been implicated in the regulation of *CFTR* transcription [16–22]. For instance, CCAAT-enhancer-binding protein (*C/EBP*) δ positively regulates *CFTR* transcription by binding to an inverted CCAAT element in the promoter [16]. In addition, *C/EBP* β binds to a DNase I-hypersensitive site that is present only in tissues expressing *CFTR* [23] and we recently demonstrated its binding to *CFTR* minimal promoter [24]. Chromatin structures that facilitate long-range interactions between various regulatory elements cluster specifically to the *CFTR* promoter exclusively in *CFTR* expressing cells [25, 26]. Recently, it was reported that *trans*-interacting Forkhead Box A (FOXA) factors induce *CFTR* activation through binding to a key *CFTR* *cis*-regulatory element located in introns 10 and 11 [27–29]. *CFTR* expression is post-transcriptionally regulated also by miRNAs, such as miR-145 and miR-494 [30–32]. Indeed, several miRNAs, including miR-145, are expressed in primary adult human airway epithelial cells where *CFTR* expression is low [30]. Moreover, increased expression of some miRNAs has been reported in bronchial epithelium and primary culture of airway epithelia from patients with cystic fibrosis compared to healthy controls [33, 34].

Nevertheless, the developmental control of *CFTR* expression is still poorly understood in humans and the identification of *cis*- and *trans*-acting factors responsible for this complex spatio-temporal regulation is challenging. The aims of this study were 1) to identify *trans*-regulatory elements responsible for the differential expression of *CFTR* in fetal and adult lung; and 2) to determine the importance of inhibitory motifs in the 3'UTR of *CFTR* in order to develop new tools for *CFTR* mutation correction in patients with cystic fibrosis.

Materials and methods

Gene reporter vectors, expression plasmid constructs and directed mutagenesis

The pGL3b-*CFTR*-WT vector has been previously described [35]. The 3'UTR of the *CFTR* gene (1.7 kb from the termination codon to the poly-adenylation signal) was subcloned in the pGL3-control vector (Promega, Charbonnières, France) downstream of the *Luciferase* gene (pGL3C-*CFTR*-3UTR). The expression plasmids used are listed in supplementary table S1. Point mutations in *cis*-motifs to abolish binding were introduced by direct mutagenesis using the QuickChange[®]II site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Massy, France). All constructs were verified by direct sequencing.

Short-interfering RNAs (siRNAs), miRNA precursors and miRNA-binding blocker oligonucleotides (MBBOs) are described in supplementary table S2.

Cell culture

The cell lines and culture media used for this work are described in table 1.

Nasal cells from healthy individuals or patients with cystic fibrosis and homozygous for the p.Phe508del *CFTR* mutation were obtained by scratching the inferior turbinate epithelium with ASI Rhino-Pro[®] currettes (Arlington Scientific, Springville, UT, USA). All signed informed written consent and this research project received the agreement by the French ethical research committee (N[°]ID-RCB 2011-A01520-41). Nasal cells were cultured in an air–liquid interface (ALI) culture system as previously described [37] with minor

TABLE 1 Description of cells used

Cells	Providers [#]	Characteristics	Stage	Donor	Type	Coating	Medium	Culture
A549	ATCC	Human pulmonary epithelial cell line	Adult		Cell line	No	As previously described [35]	37°C, 5% CO ₂
Beas-2B	ATCC	Human bronchial epithelial cell line	Adult		Cell line	No	As previously described [35]	
T84	ATCC	Human colic epithelial cell line	Adult		Cell line	No	As previously described [35]	
HBEpic	ScienCell, Clinisciences	Human fetal bronchial epithelial cells	Fetal	Fetus, age 20 weeks, female Fetus, age 21 weeks, male Fetus, age 22 weeks	Primary culture	Collagen I	Bronchial epithelial cell medium (BEpiCM, ScienCell, Clinisciences)	
Human whole lung	DV Biologics, Cambridge Bioscience	Human whole lung cells	Fetal	Fetus, second trimester	Primary culture	Collagen I	Fibroblast cell culture media (DV Biologics, Cambridge Bioscience)	
CF BE41o-	D.C. Gruenert (San Francisco, CA, USA)	Human pulmonary epithelial cell line (p.PHE508del/p.PHE508del)	Adult		Cell line	No	As previously described [36]	
16HBE14o-		Human pulmonary epithelial cell line (N/N)	Adult		Cell line	No	As previously described [36]	

[#]: full details of the providers are as follows. ATCC, Manassas, VA, USA; ScienCell, Carlsbad, CA, USA; Clinisciences, Montrouge, France; DV Biologics, Costa Mesa, CA, USA; Cambridge Bioscience, Cambridge, UK.

modifications. All the media used were supplemented with antibiotics and all the supports were coated with collagen I. After 3 weeks of growth in monolayer, 300 000 cells per well were plated in collagen I-coated 12 mm Transwell-Clear® supports, 0.4 µm pore size (Corning Inc., Corning, NY, USA). The ALI medium in the upper compartment was removed after confluence and the medium in the lower compartment was changed every 2–3 days. Experiments were performed when epithelial cells were well differentiated by visual inspection (at least 28 days).

Transient transfections

All the details of the transient transfection assays are in supplementary table S3.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted, reverse transcribed and amplified as previously described [38]. miRNAs were purified with the miRNeasy Mini Kit and the RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription was performed using 40 ng of miRNA and the miRCURY LNA™ Universal cDNA Synthesis Kit (EXIQON, Vedbaek, Denmark) and qPCR was performed with a 1:10 dilution of first strand DNA and microRNA LNA™ primers specific for each miRNA (EXIQON). The relative expression levels were calculated using the comparative DDCT method with *SNORD44* and *SNORD48* small nucleolar RNAs as endogenous controls.

Quantitative chromatin immunoprecipitation assays

Quantitative chromatin immunoprecipitation (Q-ChIP) was carried out as previously described [24]. Purified cross-linked chromatin was immunoprecipitated with 3 µg of each antibody (Santa Cruz, Heidelberg, Germany; Clinisciences, Montrouge, France). As a control for nonspecific DNA binding, 3 µg of anti-immunoglobulin G antibodies were used (Santa Cruz, Clinisciences). Results were expressed relative to the input signal and to nonspecific immunoprecipitated chromatin.

Electromobility shift assay

Electromobility shift assay (EMSA) was performed as previously described [17].

Reporter assay

Cells were harvested 48 h after transfection and the activity of firefly luciferase and Renilla luciferase was measured using the Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega).

Labelling, detection and analysis for miRNA profiling

Total RNA (100 ng) from A549 and HBEpC cells was labelled using the Agilent miRNA Complete Labeling and Hybridization Kit (Agilent Technologies, Massy, France) and then hybridised to the Agilent Human miRNA Microarray (V2, Agilent) that contains probes for 723 mature human miRNAs. Arrays were scanned using an Agilent scanner and features were extracted with the Agilent Feature Extraction software (version 10.5.1.1). Expression data were initially normalised to the 75th percentile and then averaged among the groups using the GeneSpring GX (Agilent) software. The Kruskal–Wallis test was used for group comparisons and the Benjamini–Hochberg correction was applied to adjust for multiple comparisons. Unsupervised hierarchical clustering was performed using the GeneSpring GX software.

Western blotting

Whole proteins were extracted using 1X Laemmli buffer. Proteins were separated on 7% or 10% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membrane (Westran® Clear Signal Whatman®; Dominique Dutscher, Issy les Moulineaux, France). Antibodies and concentrations used are described in the captions to the figures.

CFTR activity

CFTR activity was assessed by iodide-mediated quenching of the halide-sensitive yellow fluorescent protein (YFP), as previously described [36], using the Premo Halide sensor technology (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). 40 h after incubation with MBBOs or negative control, CFTR conductance was stimulated with an agonist mixture (forskolin, 3-isobutyl-1-methylxanthine, apigenin) for 10 min. Then, CFTR-mediated iodide efflux was measured in each individual well by recording the fluorescence emission continuously (400 ms per point) for 2 s (baseline) and after addition of 50 μ L of 140 mM iodide solution.

Statistical analysis

Q-ChIP, luciferase and RT-qPCR assays were performed at least three times and samples were analysed at least in triplicate. The t-test was employed for paired comparisons using InStat (GraphPad Software, version 3.0, InStat 3 folder). For assessing the effect of MBBOs, the Wilcoxon signed rank test was used with the R software to generate box plots with significances.

Results**Transcription factors involved in the regulation of CFTR temporal expression**

To identify the regulatory elements that participate in *CFTR* downregulation in human lung after birth, we used primary human fetal bronchial epithelial cells (HBEpC, three primary cultures from three different donors, gestational age in table 1) and whole lung cells as well as the A549 and Beas-2B cell lines (from adult human lung). *CFTR* transcript level in fetal HBEpC and whole lung cells was comparable or even higher than in T84 cells, in which *CFTR* is constitutively expressed (fig. 1a) [39]. Moreover, *CFTR* expression in HBEpC and whole lung cells was more than four-fold higher than in A549, Beas-2B cells and in adult lung RNA from healthy individuals. Based on the well-known *CFTR* expression profile in fetal and adult lung [12, 13], we considered that HBEpC cells are a representative model of fetal lung cells and that *CFTR* expression in A549 and Beas-2B cells is comparable to that of adult lung.

To identify putative *cis*-regulatory motifs, by using open-source bioinformatics software we then performed an *in silico* analysis of the *CFTR* 5'UTR. We thus focused on the transcription factors FOXA and C/EBP, based on two criteria: 1) their high score in predicted transcription factor binding and 2) their involvement in lung morphogenesis. First, we confirmed FOXA and C/EBP binding to the *CFTR* minimal promoter by Q-ChIP (fig. 1b). Moreover, EMSA showed that C/EBP β and FOXA2 bind directly to the targeted region (fig. 1c).

Next, we investigated the role of these transcription factors in the regulation of *CFTR* promoter activity. When overexpressed in A549 and Beas-2B cells (adult lung), FOXA1, FOXA2 and C/EBP α had a repressive effect on *CFTR* transcription (fig. 2a and b). In line with this result, FOXA1, FOXA2 and C/EBP α silencing using specific siRNAs increased *CFTR* expression (fig. 2a and b). As control, qPCR and western blot showed that endogenous transcription factor levels were strongly reduced in the presence of each specific siRNA (fig. S1). Conversely, in fetal HBEpC cells, FOXA1 and FOXA2 did not have any effect, while C/EBP α strongly induced *CFTR* transcription (fig. 2c). Finally, C/EBP β overexpression increased endogenous *CFTR* transcript level in A549 (2 \times) and Beas-2B (3 \times) cells and even more in HBEpC cells (30 \times) (fig. 2a–c). Analysis of the endogenous level of each transcription factor showed a homogeneous expression in the different cell lines (fig. S2).

As FOXA and C/EBP factors do not act alone, we re-examined the *in silico* analysis data by using a lower cut-off in order to select other transcription factors that may contribute to *CFTR* regulation. Possible candidates of this transcription factor network included RREB-1 (the transcription factor with the highest score), several transcription factors with a known effect on *CFTR* gene expression, such as USF2, SRF and

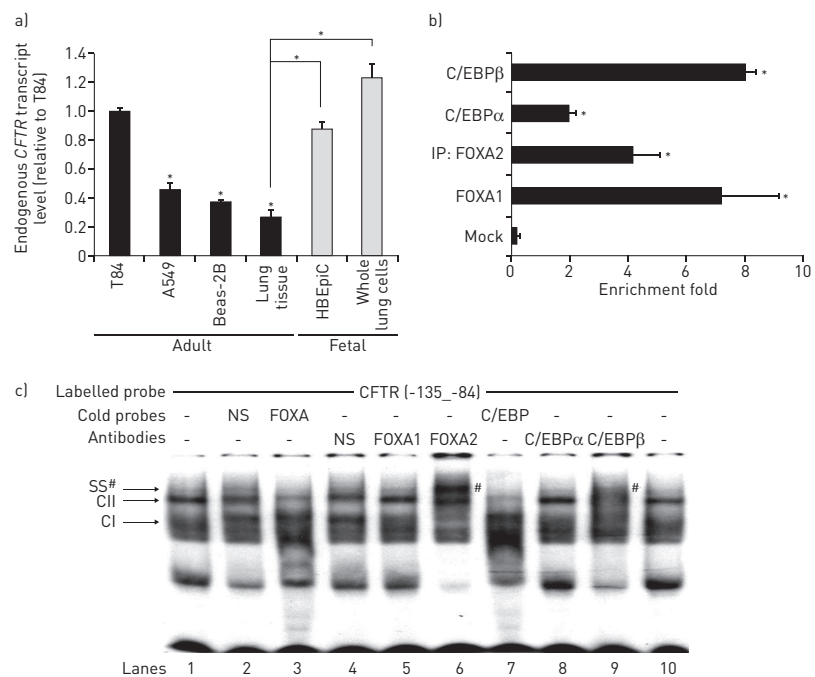


FIGURE 1 C/EBP and FOXA transcription factors bind to the *CFTR* promoter. a) Quantification of endogenous *CFTR* transcript level in lung cells compared to the T84 cell line by RT-qPCR. Data were normalised to β -actin transcript level. b) Binding affinity of the FOXA1, FOXA2, C/EBP α and C/EBP β transcription factors for the *CFTR* promoter. Chromatin from A549 cells was immunoprecipitated (IP) with specific antibodies against FOXA1, FOXA2, C/EBP α and C/EBP β or with nonspecific antibodies (IP mock). Data were normalised to non-immunoprecipitated chromatin. c) FOXA and C/EBP transcription factors bind to the -135 to -84 bp region of the *CFTR* promoter in A549 cells. Electromobility shift assay was performed with specific radiolabelled probes (CFTR-135_-84) incubated with A549 nuclear proteins. Specificity was assessed by competition with an excess of (FOXA and C/EBP) cold probes compared to a nonspecific probe (NS). Supershift (SS) assay was performed with specific anti-FOXA1, -FOXA2, -C/EBP α and -C/EBP β antibodies compared to a nonspecific antibody (NS). Arrows highlight specific complexes (CI and CII). *: $p < 0.0001$.

YY1 [17, 18, 35], and transcription factors involved in lung morphogenesis, but with a lower score than C/EBPs and FOXAs (SOX17, FOXF1 and NKX2.1) [40]. We then used reporter assays to investigate whether these regulatory elements could participate in the temporal regulation of *CFTR* expression. Co-transfection of the pGL3b-*CFTR*-WT reporter vector (wild-type minimal *CFTR* promoter) with the ubiquitously expressed USF2 and SRF or the developmental-specific NKX2.1 induced luciferase activity in adult and fetal lung cells (fig. 2d). A forced expression of YY1 protein caused a strong decrease in reporter activities (~50% of the control luciferase value). Conversely, RREB-1 inhibited *CFTR* transcriptional activity in the adult pulmonary A549 and Beas-2B cell lines but not in primary fetal HBEpiC cells. Similarly, the activating effect of SOX17 and FOXF1 in fetal HBEpiC cells was reduced or even abolished in A549 and Beas-2B cells.

These results show that FOXA1, FOXA2 (directly) and C/EBP α negatively regulate *CFTR* transcription in a specific manner in mature lung cells, while C/EBP β induces *CFTR* transcription through direct binding to the promoter, regardless of the temporal stage. Other transcription factors, such as SOX17, RREB-1 and FOXF1, play also a role in the temporal regulation of *CFTR* expression in fetal and adult lung.

A complex pattern of cis- and trans-acting elements in the 3'UTR of *CFTR* is involved in the temporal regulation of its expression

To evaluate the effect of the 3'UTR on the post-transcriptional regulation of *CFTR*, we then transfected A549, Beas-2B and HBEpiC cells with the pGL3C-*CFTR*-3UTR reporter vector (*CFTR* 3'UTR) or vector alone. The 3'UTR of *CFTR* strongly repressed luciferase activity in all cell types, indicating that this region

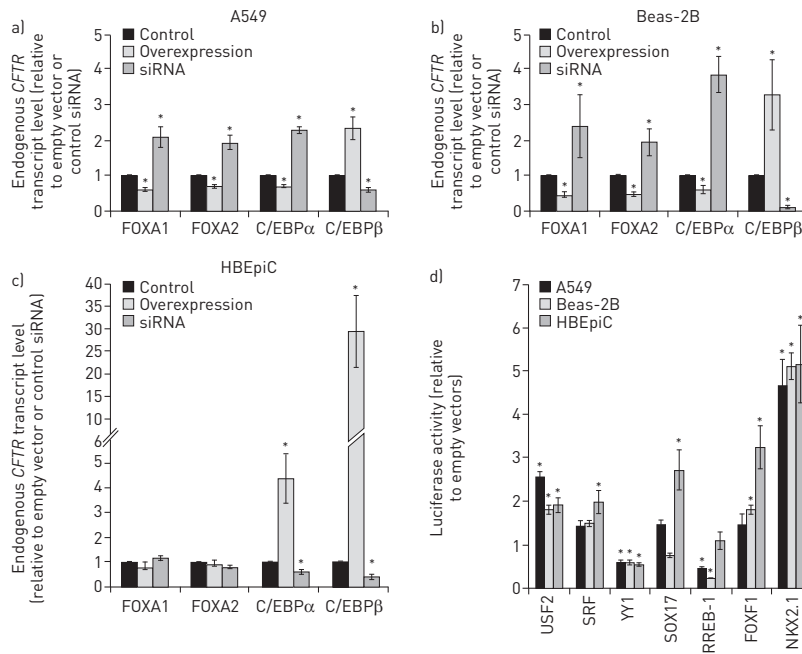


FIGURE 2 Several factors control *CFTR* transcription. a–c) Effect of FOXA1, FOXA2, C/EBP α or C/EBP β overexpression or silencing with specific siRNAs on the endogenous *CFTR* transcript level in adult pulmonary cells (A549 (a) and Beas-2B cells (b)) and c) fetal cells (HBEpiC cells). RT-qPCR data were normalised to β -actin transcript level. d) Role of different transcription factors in *CFTR* transcriptional activity regulation. Luciferase activity was measured in the different pulmonary cell lines following co-transfection of the pGL3b-*CFTR*-WT reporter vector (wild-type minimal *CFTR* promoter) and of constructs expressing the different transcription factors. Data were normalised to the luciferase activity level following transfection of empty vector. *: p<0.0001.

contains *cis*-repressive elements (fig. 3a). Using the bioinformatic tool AREsite (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/AREsite.cgi>), we identified four new putative AU-rich elements (ARE) in the 3'UTR of the *CFTR* gene (ARE-4816, ARE-5533, ARE-5698 and ARE-6074) in addition to those previously described [41] and that we renamed ARE-4585, ARE-4760 and ARE-4891, according to their nucleotide position (fig. 3b). To determine the role of these motifs in the regulation of *CFTR* expression, we transfected A549, Beas-2B and HBEpiC cells with pGL3C-*CFTR*-3UTR reporter vectors in which each of these motifs was mutated and then measured luciferase activity. Only ARE-4760 appeared to be implicated in mRNA stabilisation because mutation of this motif was associated with a decrease in luciferase activity compared to cells transfected with pGL3C-*CFTR*-3UTR (wild-type sequence) (fig. 3b). ARE-4585, ARE-5533, ARE-5698 and ARE-6074 seemed to be involved in mRNA destabilisation in A549 and/or Beas-2B cells, whereas they had no significant effect in HBEpiC cells (fig. 3b). The strongest effect was obtained using ARE-5698, which *in silico* was identified as the most conserved ARE motif in the *CFTR* 3'UTR. Other *cis*-acting elements might explain the repressive activity of the 3'UTR of *CFTR* in adult cell lines. Computational predictions detected 13 putative miRNA-binding motifs in the *CFTR* 3'UTR (fig. 3c). Among the previously studied miRNAs, miR-145 has been involved in the regulation of *CFTR* expression in colonic and pancreatic cell lines [30]. We then assessed the role of miRNAs in the post-transcriptional control of *CFTR* in pulmonary cells by using luciferase reporter assays after transfection with miRNA precursors and the pGL3C-*CFTR*-3UTR reporter vector. MiR-942, miR-665, miR-383, miR-1290 and miR-1246 did not induce any significant effect in any cell type, whereas miR-600 reduced luciferase activity in all cell lines compared to control miRNA (fig. 3c). MiR-505, miR-943, miR-377, miR-145, miR-384 and miR-101 decreased luciferase activity in A549 and/or Beas-2B cells, but not in HBEpiC cells (fig. 3c).

As the strongest repressive effect on *CFTR* post-transcriptional regulation in A549 and Beas-2B cells was induced by miR-101, we next focused on this miRNA and confirmed its negative impact on endogenous

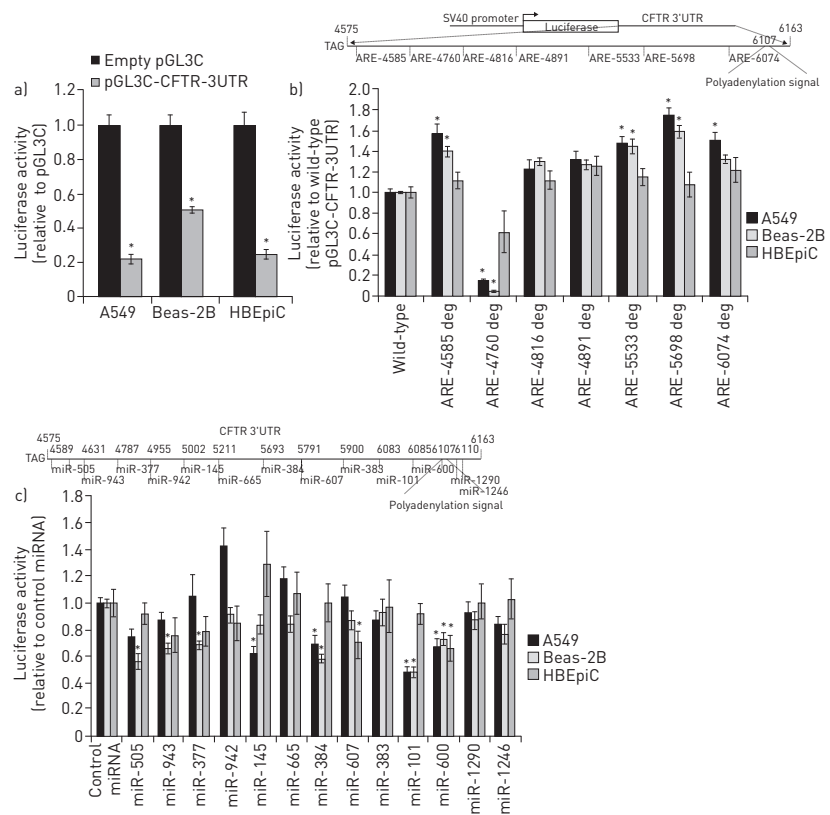


FIGURE 3 *Cis-* and *trans-*acting elements in the 3'UTR are involved in the temporal regulation of *CFTR* gene expression. **a)** Role of the *CFTR* 3'UTR. Luciferase activity was measured in the different lung cell lines after transfection of the reporter vector containing the 3'UTR of the *CFTR* gene downstream of the *Luciferase* gene (pGL3C-CFTR-3UTR). Data were normalised to those obtained with empty pGL3C vector. **b)** Importance of AU-rich element (ARE) motifs in the post-transcriptional regulation of *CFTR* expression. Each putative ARE site within the *CFTR* 3'UTR in the pGL3C-CFTR-3UTR vector was mutated and then the effect of their mutation was evaluated by measuring luciferase activity in the different pulmonary cell lines. Data were normalised to the values obtained with the wild-type reporter vector (pGL3C-CFTR-3UTR). **c)** Role of miRNAs in the post-transcriptional regulation of *CFTR* expression. Precursors of the miRNAs predicted to bind to the *CFTR* 3'UTR were transfected in the different pulmonary cell lines and then luciferase activity was measured. Data were normalised to the LNATM miRNA inhibitor negative control oligonucleotide (control miRNA; EXIQON, Vedbaek, Denmark). *: $p < 0.0001$.

CFTR transcript level after transfection in adult pulmonary cells (fig. 4a). After transfection of the miR-101 precursor, miR-101 overexpression was verified in the three cell lines (fig. 4b). We also confirmed the endogenous expression of miR-101 and its differential expression in A549, Beas-2B (adult) and HBEpiC cells (fetal) (fig. 4c).

Previous studies demonstrated that miRNA-mediated regulation might require the presence of an ARE sequence [42–44]. As the miR-101 and miR-600 binding sites overlap with the ARE-6074 motif and the miR-384 binding site overlaps with the ARE-5698 motif (fig. 4d), we asked whether the effect of these miRNAs following binding to the 3'UTR of *CFTR* is dependent on the integrity of the ARE motifs. To this aim we co-transfected the miR-101, miR-600 and miR-384 precursors with reporter vectors containing wild type or mutated *CFTR* 3'UTR. Only miR-101 lost its repressive effect on luciferase activity following the mutation of its binding site within the *CFTR* sequence or abrogation of the ARE-6074 (fig. 4d). Mutation of ARE-6074 and ARE-5698 did not affect the activity of miR-600 and miR-384, respectively.

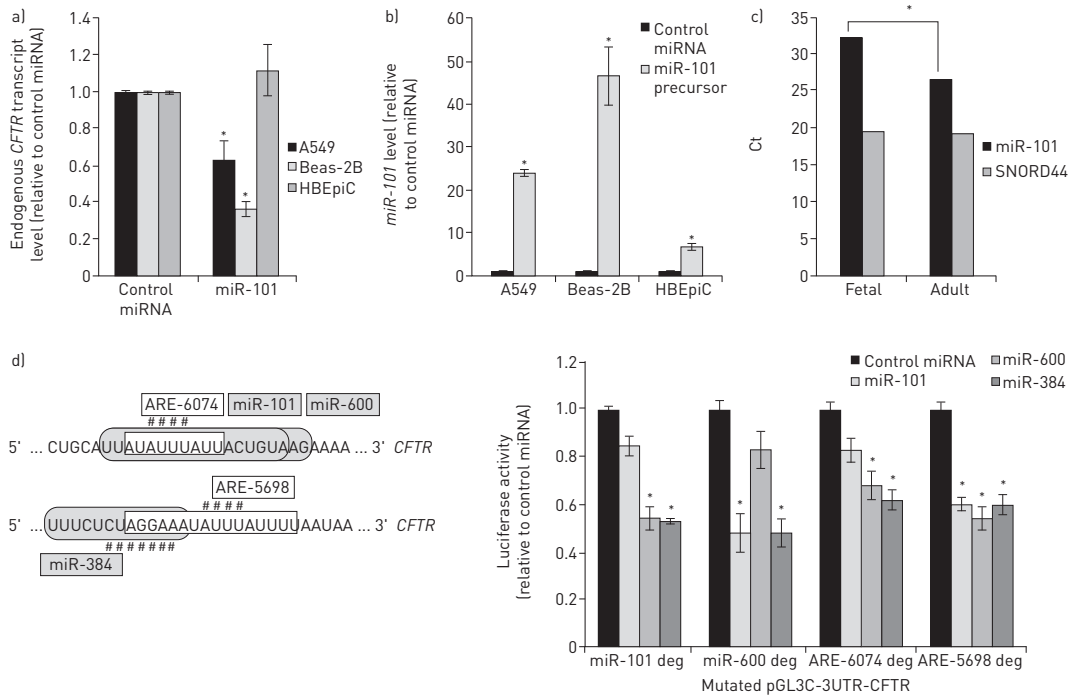


FIGURE 4 Role of miR-101. a) Effect of miR-101 over-expression on the endogenous *CFTR* transcript level in the different pulmonary cell lines. Data were normalised to β -actin transcript level. b) Control of miR-101 over-expression in the three cell lines. Hsa-miR-101 level was quantified by RT-qPCR (EXIQON, Vedbaek, Denmark) after transfection of miR-101 precursor or control miRNA in pulmonary cell lines. Data were normalised to *SNORD44* transcript level. c) Endogenous miR-101 expression level in fetal (HBEpiC) and adult (A549) lung cells. Data were compared to the expression of the internal control *SNORD44*. d) Overlapping AU-rich element (ARE) and miRNA binding sites in *CFTR* 3'UTR. AREs are represented by white squares, miRNA binding sites by grey squares. *, mutated nucleotides. Involvement of *cis*-elements in miRNA effect on *CFTR* post-transcriptional activity. The role of miR-101, miR-600 and miR-384 was evaluated by measuring luciferase activity in A549 cells after co-transfection of each miRNA precursor with a reporter vector containing the *CFTR* 3'UTR in which the binding site for miR-101 or miR-600 (miR-101-deg and miR-600-deg), or the ARE-5698 or ARE-6074 motif (ARE-5698-deg and ARE-6074-deg) was mutated. Data were normalised to the luciferase activity in cells transfected with control miRNA. *: $p < 0.0001$.

As miRNAs have been previously described in lung development mainly in mice, we investigated their differential expression in adult human lung tissue and fetal primary whole lung cells using Agilent DNA microarrays. Analysis of the microarray data showed that 65 miRNAs had the highest expression variability between adult and fetal lung. Among the 30 probes with the strongest expression difference between adult and fetal lung (supplementary table S4), we found that miR-451, miR-150 and miR-145 were specifically upregulated in adult lung (fig. 5a). We confirmed the endogenous expression of miR-145 and its differential expression in A549, Beas-2B (adult) and HBEpiC cells (fetal) (fig. 5b).

These data demonstrate the implication of miRNAs in the tightly controlled developmental regulation of *CFTR* expression and, more particularly, of miR-101 and miR-145, the expression of which is higher in adult than in fetal lung. Moreover, they show that miR-101 directly acts on its cognate site in combination with an overlapping ARE motif.

From identifying crucial regulators of *CFTR* expression to testing new potential therapeutic tools for cystic fibrosis

The region encompassing the miR-101 binding site and ARE-6074 is critical for the miR-101 role in the regulation of *CFTR* expression. Based on this observation, we designed MBBOs to prevent binding of several miRNAs, including miR-101, miR-600, miR-145 and miR-384, to the 3'UTR of *CFTR*. Co-transfection of these MBBOs with the pGL3C-*CFTR*-3UTR reporter vector led to a 1.5- to 6-fold increase of

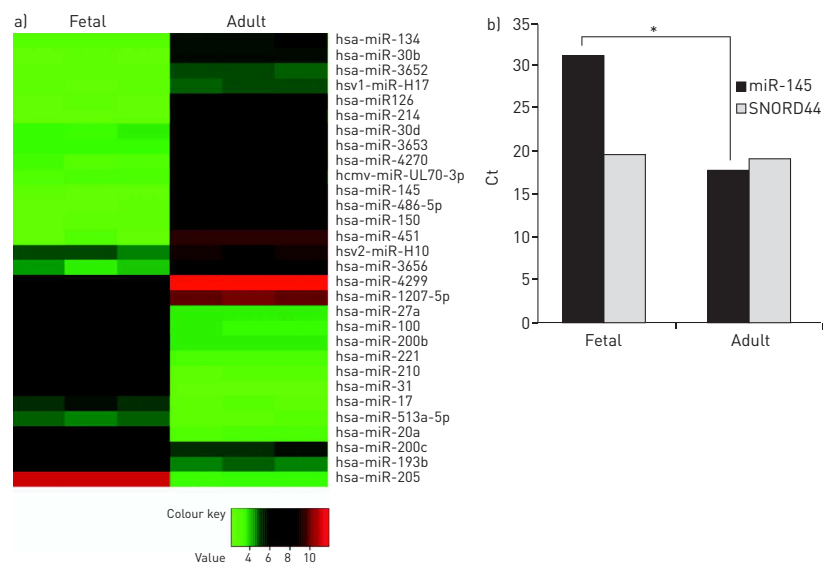


FIGURE 5 miRNA profiling revealed overexpression of miR-145 in adult lung tissues. a) Hierarchical cluster analysis of the miRNAs that are differentially expressed in adult *versus* fetal lung tissue. Microarray was performed using total miRNA from fetal (HBEpiC) and adult pulmonary (A549) cells. b) Endogenous miR-145 expression level in fetal (HBEpiC) and adult (A549) lung cells. Data were compared to the expression of the internal control SNORD44. *: $p < 0.0001$.

luciferase activity in Beas-2B and A549 cells, respectively (fig. 6a). The positive effect on endogenous *CFTR* expression upon MBBO-1 transfection was confirmed in these cells (fig. 6b).

Next, we evaluated the effect of the MBBOs *ex vivo* because mutant mice do not develop the characteristic manifestations of human cystic fibrosis. To this aim, we added medium containing control oligonucleotide, MBBO-1 or MBBO-3 without any transfection reagent to the upper compartment of Transwell-Clear® supports in which reconstituted ALL epithelial cells obtained from human nasal cells of control individuals ($n=8$) and CF patients homozygous for the p.Phe508del mutation ($n=6$) were cultured. After 2 h at 37°C, the medium was removed from the upper compartment to restore the ALL. Freshly prepared control oligonucleotide or MBBOs were added every 2 days and *CFTR* expression was assessed 24 h post-treatment. MBBO effect was even stronger in epithelial cells from control individuals. Indeed, MBBO-1 induced a 2- to 6-fold increase of the endogenous *CFTR* expression in the epithelium derived from healthy individuals (fig. 6c) compared to the 2- to 3-fold increase in cells from patients with CF (fig. 6d). This effect was not significantly improved by repeated incubation with MBBO-1.

MBBO-1 and MBBO-3 significantly increased *CFTR* mRNA (fig. 7a) and protein expression (fig. 7b) in cystic fibrosis epithelia compared to control oligonucleotide. We next investigated MBBO effect on *CFTR* channel activity by using a functional assay (iodide-mediated quenching of the halide-sensitive YFP variant) and the human bronchial epithelial cell lines CFBE41o- (derived from a patient with cystic fibrosis) and 16HBEo- (normal phenotype). We first confirmed the absence of *CFTR*-dependent anion transport in CFBE41o- cells (cystic fibrosis) compared to 16HBEo- (non-cystic fibrosis) cells in which iodide entered and quenched YFP fluorescence (fig. 7c). Addition of Inh-172 (a *CFTR* inhibitor) in non-cystic fibrosis cells led to results comparable to those obtained in cystic fibrosis cells, confirming that the assay measures *CFTR*-dependent anion transport. Incubation with MBBO-1 and MBBO-3 for 2 h, significantly increased anion transport in cystic fibrosis cells compared to untreated cells (fig. 7d) and fluorescence quenching was proportional to the amount of *CFTR* detected in the cells by immunoblotting.

These data support the importance of the regions encompassing the miR-101 and miR-145 binding sites in *CFTR* regulation and suggest that MBBOs could represent a new therapeutic option for CF.

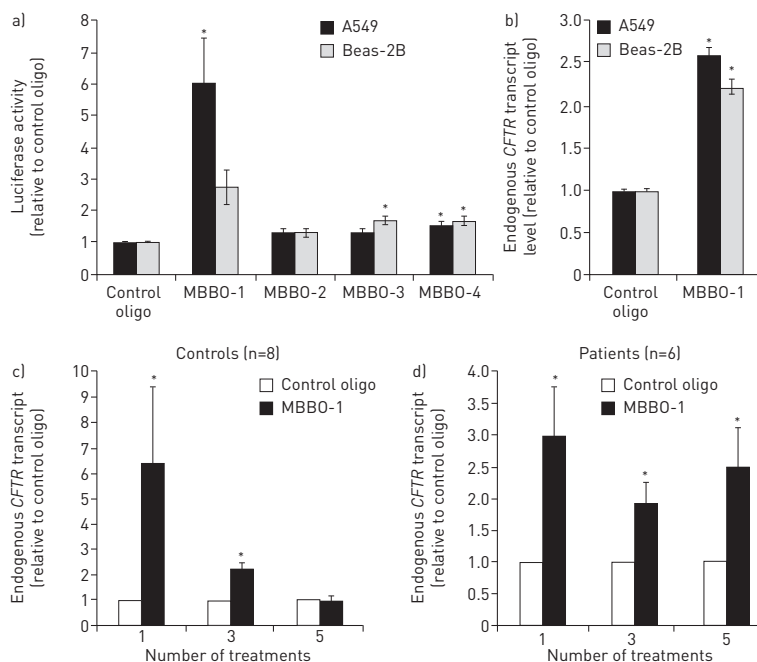


FIGURE 6 Effect of miRNA-binding blocker oligonucleotides (MBBOs) on *CFTR* expression in pulmonary cells. a) Effect of different MBBOs on *CFTR* post-transcriptional regulation. MBBOs (100 nM) were transfected together with the pGL3C-*CFTR*-3'UTR reporter vector in A549 and Beas-2B pulmonary cells and luciferase activity data were normalised to miRCURY LNA™ microRNA Inhibitor Negative Control (control oligonucleotide; EXIQON, Vedbaek, Denmark). b) Effect of MBBO-1 on the endogenous *CFTR* transcript level in A549 and Beas-2B pulmonary cells. *CFTR* mRNA level was assessed by RT-qPCR following the transfection of MBBO-1 or control oligonucleotide. Data were normalised to β -actin transcript level. c, d) Effect of MBBO-1 on the endogenous *CFTR* transcript level in nasal epithelial cells from c) healthy controls (n=8), or from d) CF patients homozygous for the p.Phe508del mutation (n=6). *CFTR* mRNA level was assessed by RT-qPCR 24 h after one, three or five treatments with MBBO-1 or control oligonucleotide. Data were normalised to β -actin transcript level. *: $p < 0.0001$.

Discussion

Expression studies carried out in humans, mice and goats have revealed that the *CFTR* gene is developmentally regulated [10, 12–14, 45]. The most well-known site of developmentally regulated *CFTR* expression is the airway surface epithelium, with relatively high expression during embryonic and fetal development, followed by a marked decrease in expression after birth [45]. Despite extensive studies, the mechanisms accounting for this switch in *CFTR* expression remain unknown.

In a critical region of the *CFTR* gene that contains several naturally occurring variants [18, 35, 46], we found many ubiquitous [17, 18] and tissue- or lung developmental-specific transcription factors [40] involved in coordinating the switch from strong to very low *CFTR* expression in lungs after birth. The specific occupancy of these factors on the promoter may, in interaction with others factors, including FOXA1 and C/EBP β that bind to other part of the *CFTR* gene depending on the nucleosome positioning [28], influence the particular pattern of expression of this gene. We also show that miRNAs, including miR-101 and miR-145, negatively regulate the level of *CFTR* transcripts in adult lung cells, whilst having no effect in fetal lung cells. In addition to its specific role in mature lung cells, miR-101 decreases luciferase activity in an embryonic kidney cell line [31], whereas it does not affect *CFTR* mRNA stability in pancreatic cell lines [30], suggesting a potential role as a tissue-specific factor. We then demonstrate the implication of miRNAs in the tightly controlled developmental regulation of *CFTR* expression and more particularly we show that miR-101 acts on its cognate site in combination with an overlapping ARE motif.

Finally, we demonstrate the benefit of characterising regulatory factors to identify novel therapeutic targets. Early studies indicated that complementation of just 6–10% of *CFTR* transcripts generate enough *CFTR*

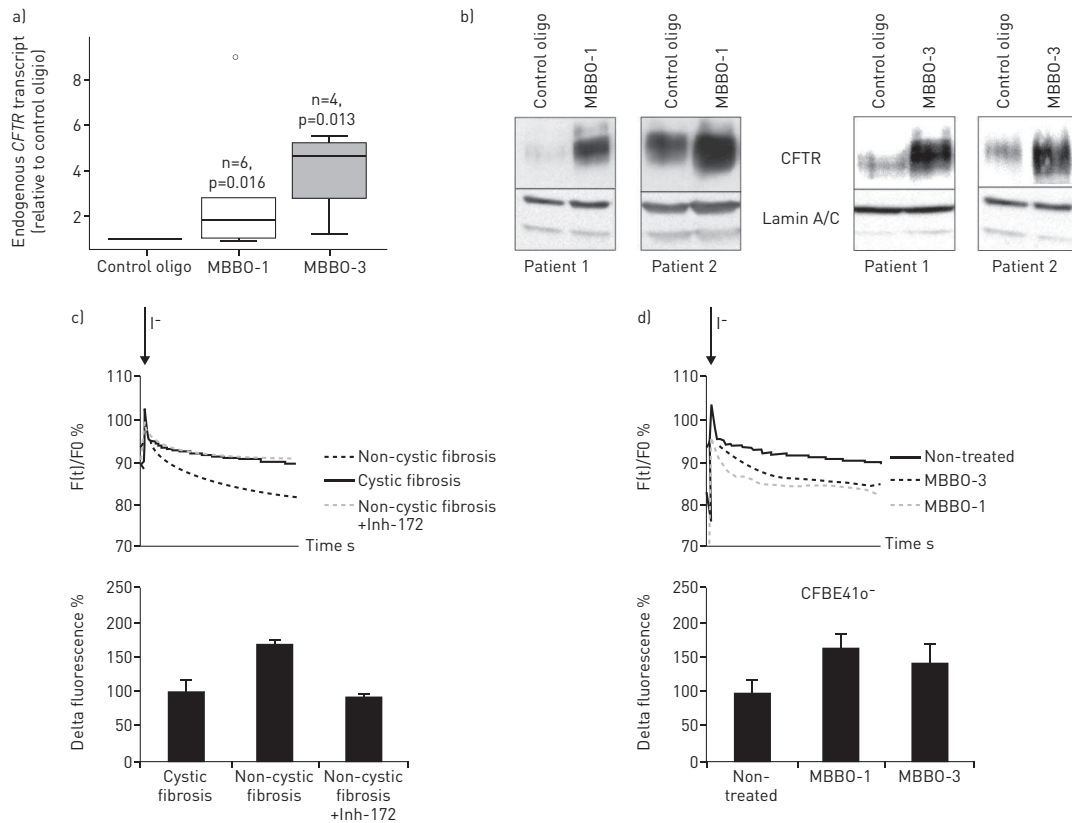


FIGURE 7 Effect of miRNA-binding blocker oligonucleotides (MBBOs) on CFTR expression and activity in epithelial cells from cystic fibrosis (CF) patients. **a)** Effect of MBBO-1 and MBBO-3 on endogenous *CFTR* transcript level in nasal epithelial cells from CF patients who are homozygous for the p.Phe508del mutation (24 h after the first treatment with 100 nM MBBO-1, MBBO-3 or control oligonucleotide at 37°C for 2 h). Data were normalised to *β -actin* transcript level. **b)** Effect of MBBO-1 and MBBO-3 on endogenous CFTR protein level in nasal epithelial cells from CF patients who are homozygous for the p.Phe508del mutation. Immunoblots were performed with an anti-CFTR antibody (1:400, clone MM13-4; Millipore, Molsheim, France) using total protein extracts prepared 24 h after the first treatment with MBBO-1, MBBO-3 or control oligonucleotide. Lamin A/C protein level (1:10,000, anti- Lamin A/C antibody; Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was used as loading control. **c, d)** Representative cell fluorescence recordings from bronchial cells that transiently express halide-sensitive yellow fluorescent protein (YFP) (the scale bar reports the percentage of total cell fluorescence). CFTR activity was measured in **c)** 16HBEo⁻ (non-cystic fibrosis) and CFBE41o⁻ (cystic fibrosis) cells, and in **d)** non-treated or MBBO-treated CFBE41o⁻ cells. Extracellular addition of iodide (arrow) caused YFP quenching at a rate that is proportional to iodide influx and CFTR activity. Channel opening is signalled by a decrease of the probe fluorescence. Quenching is directly proportional to the chloride efflux. Graphs show the quantification of the obtained data. *: $p < 0.0001$.

levels to maintain normal chloride transport in epithelia [47]. These data are supported by findings that the presence of a naturally occurring sequence variation in the *CFTR* promoter, in *cis* of a severe mutation, increases transcription. This can allow the production of enough CFTR protein to reach the apical membrane cells and restore partial CFTR channel function, thus inducing a moderate cystic fibrosis phenotype despite the presence of a severe disease-causing mutation [35]. Similarly, stabilisation of p.Phe508del CFTR protein has been associated with increased p.Phe508del CFTR channel activity [48]. Recent work demonstrated that miR-138 mimics might restore CFTR-Phe508del expression and a functional chloride transport [32]. However, the authors underlined the fact that miR-138 mimics may have undesirable effects because miR-138 targets SIN3, a highly conserved transcriptional repressor which regulates many genes [32]. Over the past four decades, therapies for cystic fibrosis have focused entirely on symptoms to improve the patients' quality of life. The first treatment (VX-770) targeted the basic defect in p.Gly551Asp-CFTR (1.6% of patients with cystic fibrosis worldwide) [49]. The new molecule VX-809 has been investigated for patients carrying the p.Phe508del CFTR mutation; however, alone no clear

improvement has been reported [50] and clinical trials testing the combination of different molecules are in progress. Herein, we tested a new putative therapeutic tool that specifically targets the *CFTR* gene [51]. Focusing on miR-101 and miR-145, we designed MBBOs that target the miRNA binding sites in the *CFTR* 3'UTR instead of the miRNA itself. This blockage led to the correction of CFTR channel activity through stabilisation of *CFTR* mRNA and increase in the protein level in nasal epithelial cells from patients homozygous for p.Phe508del, the most frequent *CFTR* mutation. As miR-101 and miR-145 knock-down is associated with deregulation of epigenetic pathways resulting in cancer progression [52] and lung cancer [53], our approach in which MBBOs block only their binding to their cognate *CFTR* mRNA motif may have therapeutic benefits by stabilising *CFTR* transcripts and ultimately providing enough functional protein to improve the patients' phenotype without disturbing other signalling cascades. These findings underline the importance in the continued understanding of pathways that are targeted in the lung after birth, which could ultimately lead to new targets in lung disorders, especially in cystic fibrosis.

Acknowledgements

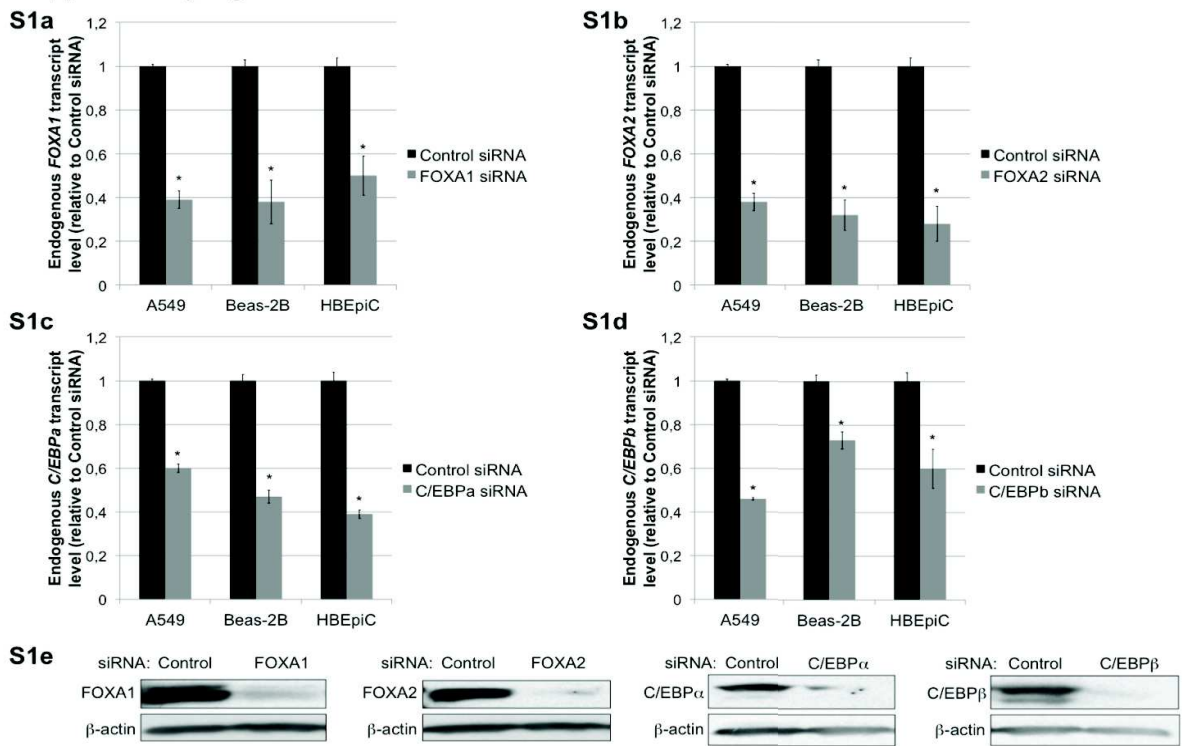
This work was supported by grants from the French association Vaincre La Mucoviscidose, the CHU and INSERM. V. Viart and J. Bonini were supported by PhD studentships from Vaincre La Mucoviscidose. The authors thank Isabelle Vachier for her help in obtaining agreement from the French ethical research committee. The authors also thank the investigators mentioned in supplementary table S1 for the gifts of crucial reagents.

References

- Higgs DR, Vernimmen D, Hughes J, et al. Using genomics to study how chromatin influences gene expression. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; 8: 299–325.
- Martinez NJ, Walhout AJ. The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. *Bioessays* 2009; 31: 435–445.
- Shalgi R, Brosh R, Oren M, et al. Coupling transcriptional and post-transcriptional miRNA regulation in the control of cell fate. *Aging (Albany NY)* 2009; 1: 762–770.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W, et al. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 597–610.
- Dong J, Jiang G, Asmann YW, et al. MicroRNA networks in mouse lung organogenesis. *PLoS One* 2010; 5: e10854.
- Chou JL, Rozmahel R, Tsui LC, et al. Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 24471–24476.
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, et al. The cystic fibrosis gene has a “housekeeping”-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin. *J Biol Chem* 1991; 266: 9140–9144.
- Koh J, Sferra TJ, Collins FS. Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator promoter region. Chromatin context and tissue-specificity. *J Biol Chem* 1993; 268: 15912–15921.
- White NL, Higgins CF, Trezise AE. Tissue-specific *in vivo* transcription start sites of the human and murine cystic fibrosis genes. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 363–369.
- Harris A, Chalkley G, Goodman S, et al. Expression of the cystic fibrosis gene in human development. *Development* 1991; 113: 305–310.
- McCray PB Jr, Reenstra WW, Louie E, et al. Expression of CFTR and presence of cAMP-mediated fluid secretion in human fetal lung. *Am J Physiol* 1992; 262: L472–L481.
- Trezise AE, Chambers JA, Wardle CJ, et al. Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 213–218.
- Tizzano EF, O'Brodovich H, Chitayat D, et al. Regional expression of CFTR in developing human respiratory tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 355–362.
- Marcocelles P, Montier T, Gillet D, et al. Evolution of CFTR protein distribution in lung tissue from normal and CF human fetuses. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42: 1032–1040.
- Cohen JC, Larson JE, Killeen E, et al. CFTR and Wnt/beta-catenin signaling in lung development. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 70.
- Pittman N, Shue G, LeLeiko NS, et al. Transcription of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a CCAAT-like element for both basal and cAMP-mediated regulation. *J Biol Chem* 1995; 270: 28848–28857.
- Rene C, Taulan M, Iral F, et al. Binding of serum response factor to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CArG-like elements, as a new potential CFTR transcriptional regulation pathway. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 5271–5290.
- Taulan M, Lopez E, Guittard C, et al. First functional polymorphism in CFTR promoter that results in decreased transcriptional activity and Sp1/USF binding. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 775–781.
- Lopez E, Viart V, Guittard C, et al. Variants in CFTR untranslated regions are associated with congenital bilateral absence of the vas deferens. *J Med Genet* 2011; 48: 152–159.
- Zheng W, Kuhlicke J, Jackel K, et al. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-mediated repression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the intestinal epithelium. *FASEB J* 2009; 23: 204–213.
- Burnight ER, Wang G, McCray PB Jr, et al. Transcriptional targeting in the airway using novel gene regulatory elements. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47: 227–233.
- Zhang Z, Leir SH, Harris A, Immune mediators regulate CFTR expression through a bifunctional airway-selective enhancer. *Mol Cell Biol* 2013; 33: 2843–2853.
- Nuthall HN, Vassaux G, Huxley C, et al. Analysis of a DNase I hypersensitive site located -20.9 kb upstream of the CFTR gene. *Eur J Biochem* 1999; 266: 431–443.
- Viart VV, Lopez E, René C, et al. Phosphorylated C/EBPβ influences a complex network involving YY1 and USF2 in lung epithelial cells. *PLoS One* 2013; 8: e60211.

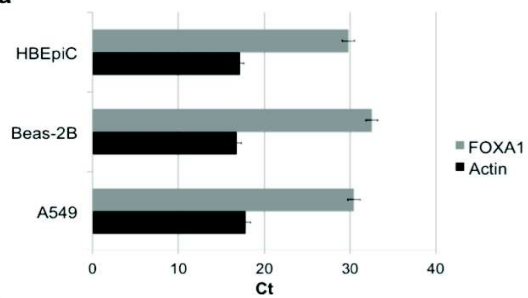
- 25 Gheldof N, Smith EM, Tabuchi TM, *et al.* Cell-type-specific long-range looping interactions identify distant regulatory elements of the CFTR gene. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 4325–4336.
- 26 Blackledge NP, Ott CJ, Gillen AE, *et al.* An insulator element 3' to the CFTR gene binds CTCF and reveals an active chromatin hub in primary cells. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 1086–1094.
- 27 Kerschner JL, Harris A. Transcriptional networks driving enhancer function in the CFTR gene. *Biochem J* 2012; 446: 203–212.
- 28 Yigit E, Bischof JM, Zhang Z, *et al.* Nucleosome mapping across the CFTR locus identifies novel regulatory factors. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 2857–2868.
- 29 Kerschner JL, Gosalia N, Leir SH, *et al.* Chromatin remodeling mediated by the FOXA1/A2 transcription factors activates CFTR expression in intestinal epithelial cells. *Epigenetics* 2014; 9: 557–565.
- 30 Gillen AE, Gosalia N, Leir SH, *et al.* MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochem J* 2011; 438: 25–32.
- 31 Megiorni F, Cialfi S, Dominici C, *et al.* Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *PLoS One* 2011; 6: e26601.
- 32 Ramachandran S, Karp PH, Jiang P, *et al.* A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 13362–13367.
- 33 Oglesby IK, Chotirmall SH, McElvaney NG, *et al.* Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by microRNA-145, -223, and -494 is altered in DeltaF508 cystic fibrosis airway epithelium. *J Immunol* 2013; 190: 3354–3362.
- 34 Ramachandran S, Karp PH, Osterhaus SR, *et al.* Post-transcriptional regulation of CFTR expression and function by microRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49: 544–551.
- 35 Romey MC, Pallares-Ruiz N, Mange A, *et al.* A naturally occurring sequence variation that creates a YY1 element is associated with increased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275: 3561–3567.
- 36 Saint-Criq V, Ruffin M, Rebeyrol C, *et al.* Azithromycin fails to reduce inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2012; 674: 1–6.
- 37 Gras D, Bourdin A, Vachier I, *et al.* An *ex vivo* model of severe asthma using reconstituted human bronchial epithelium. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1259–1266.
- 38 Viart V, Des Georges M, Claustres M, *et al.* Functional analysis of a promoter variant identified in the CFTR gene in cis of a frameshift mutation. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 180–184.
- 39 Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066–1073.
- 40 Maeda Y, Dave V, Whitsett JA. Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiol Rev* 2007; 87: 219–244.
- 41 Baudouin-Legros M, Hinzpeter A, Jaulmes A, *et al.* Cell-specific posttranscriptional regulation of CFTR gene expression via influence of MAPK cascades on 3'UTR part of transcripts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C1240–C1250.
- 42 Jing Q, Huang S, Guth S, *et al.* Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 2005; 120: 623–634.
- 43 Sun G, Li H, Rossi JJ. Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 239–252.
- 44 Glorian V, Maillot G, Poles S, *et al.* HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; 18: 1692–1701.
- 45 Broackes-Carter FC, Mouchel N, Gill D, *et al.* Temporal regulation of CFTR expression during ovine lung development: implications for CF gene therapy. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 125–131.
- 46 Romey MC, Guittard C, Carles S, *et al.* First putative sequence alterations in the minimal CFTR promoter region. *J Med Genet* 1999; 36: 263–264.
- 47 Sinn PL, Anthony RM, McCray PB Jr. Genetic therapies for cystic fibrosis lung disease. *Hum Mol Genet* 2011; 20: R79–R86.
- 48 Hutt DM, Herman D, Rodrigues AP, *et al.* Reduced histone deacetylase 7 activity restores function to misfolded CFTR in cystic fibrosis. *Nat Chem Biol* 2010; 6: 25–33.
- 49 Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, *et al.* A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 2011; 365: 1663–1672.
- 50 Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, *et al.* 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* 2012; 67: 12–18.
- 51 Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, *et al.* Correction of the F508del-CFTR protein processing defect *in vitro* by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 18843–18848.
- 52 Varambally S, Cao Q, Mani RS, *et al.* Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008; 322: 1695–1699.
- 53 Guan P, Yin Z, Li X, *et al.* Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 54.

Supplementary Figure 1

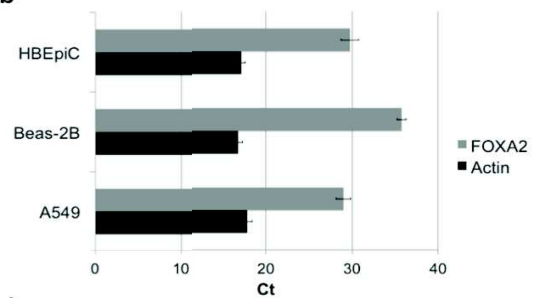


Supplementary Figure 2

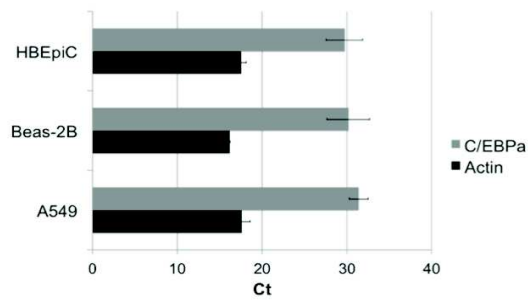
S2a



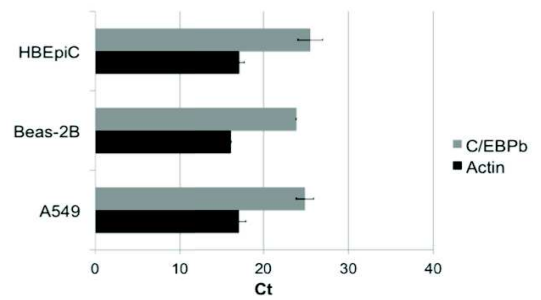
S2b



S2c



S2d



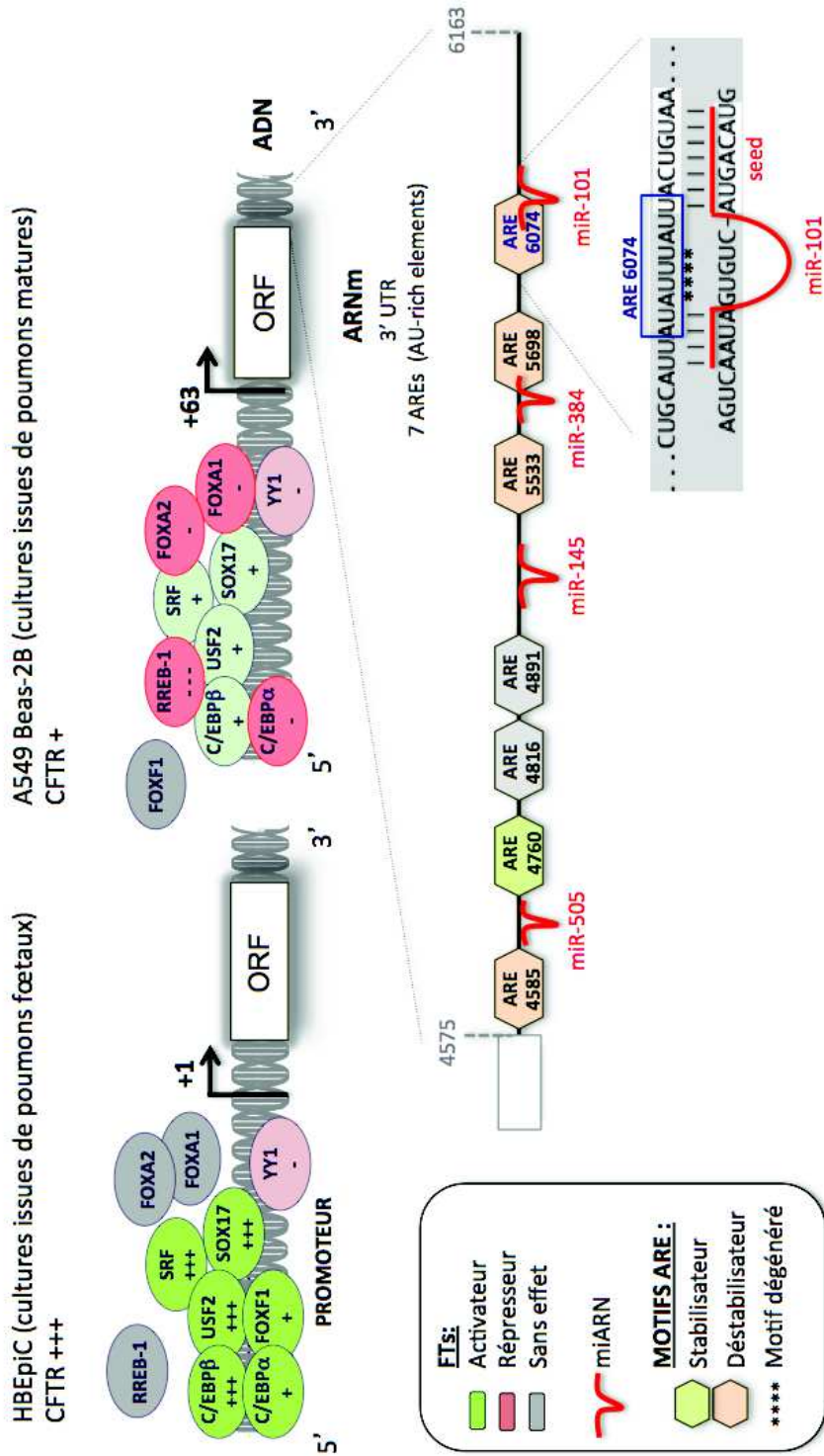


Figure 1 : Schéma récapitulatif des différents éléments *cis* et *trans*-régulateurs identifiés dans les cultures pulmonaires (Article).

4.1.3. Discussion de l'article

Etude de la région promotrice. Afin de comprendre la différence d'expression du gène *CFTR* entre le tissu pulmonaire fœtal et adulte, des modèles cellulaires dont le taux de transcrits *CFTR* endogène est proche des conditions *in vivo* ont été utilisés. Les lignées pulmonaires A549 et Beas-2B expriment un taux de transcrits *CFTR* faible similaire au tissu pulmonaire mature contrairement aux cultures primaires fœtales HBEpiC qui expriment fortement le gène *CFTR*. L'étude de facteurs de transcription clés dans la morphogenèse pulmonaire (C/EBP, FOXA, FOXF1, NKX2, SOX17) ainsi que de facteurs ubiquitaires (RREB-1, SRF, USF2 et YY1) a permis d'identifier dans ces modèles de nouveaux régulateurs impliqués dans la transcription du gène *CFTR* et dans la différence d'expression de ce dernier, entre le poumon fœtal et le poumon adulte. L'action combinée de certains facteurs a également été évaluée et a permis d'observer des effets coopératifs des facteurs activateurs.

Les protéines C/EBP α , C/EBP β et SOX17 sont également essentielles pour le bon fonctionnement des tissus pancréatiques. Il serait à présent intéressant de tester l'impact de certains de ces facteurs sur le promoteur *CFTR* dans d'autres modèles cellulaires. Ainsi, définir le rôle de ces facteurs dans des lignées cellulaires issues du tractus digestif (T-84, Caco-2) devrait permettre d'évaluer leur participation dans l'expression tissulaire de ce gène.

Puisque la recherche de facteurs de transcription est assez laborieuse et dépendante des outils de prédiction utilisés, une approche plus globale pourrait être envisagée. Dans le poumon fœtal, le site d'initiation de la transcription est défini par la position +1 tandis que dans le poumon adulte, la transcription débute en position +63 (White *et al.* 1998). Ainsi, il pourrait être envisagé de réaliser des expériences de retard sur gel couplées à des approches de spectrométrie de masse pour définir les protéines qui se fixent au niveau du promoteur. Dans des cultures pulmonaires primaires fœtales et adultes, l'utilisation de sondes contenant les deux sites d'initiation de la transcription retrouvés dans le poumon, permettrait d'identifier d'autres protéines recrutées au niveau de ces sites. Identifier les répresseurs et empêcher leur action sur le gène *CFTR* permettrait d'augmenter le taux de transcrit *CFTR*. Les facteurs de transcription reconnaissent des motifs "core" dont la taille est comprise entre 6 à 10 bp. Ils peuvent se fixer sur de courts fragments d'ADN exogène, indépendamment de leur séquence cible d'origine. Ainsi il serait intéressant, d'évaluer l'impact d'oligonucléotides leurres (*DOs* : *Decoy Oligonucleotides*) dans des modèles de cultures primaires issues de poumons matures

(Mann & Dzau 2000). Cette approche a déjà été *testée in vitro* dans un modèle CF (cellules CFTE) pour diminuer l'inflammation par l'inhibition de la fixation du facteur NF- κ B. De plus, les DOs sont plus facilement transfectables dans le noyau cellulaire et ne nécessitent pas que les cellules soient en phase de division contrairement aux plasmides (Griesenbach *et al.* 2000). Ce type d'approche pourrait donc être intéressant pour les épithéliums différenciés cultivés en interface air liquide (ALI).

Etude de la région 3'UTR. En plus d'une régulation transcriptionnelle, la stabilité des transcrits *CFTR* est régulée par la région 3' UTR. L'impact des miARNs sur l'ARNm *CFTR*, dans des cultures pulmonaires fœtales et adultes, a donc également été évalué. Pour cela des expériences de cotransfection combinant un vecteur rapporteur contenant la séquence codante du gène luciférase sous le contrôle de la région 3' UTR du gène *CFTR* et un miARN ont été réalisées. Les résultats ont montré que 4 miARNs (miR-101, miR-145, miR-384 et miR-505) ont une action répressive uniquement dans les cultures pulmonaires matures. Il serait à présent intéressant d'évaluer l'impact des miARNs sur la région 5'UTR. En effet, certains travaux montrent que les miARNs peuvent également agir sur ces régions non traduites des transcrits (Zhou & Rigoutsos 2014). Comme l'indique le schéma ci dessous, les logiciels de prédictions (miRTar) indiquent que 9 miARNs différents pourraient potentiellement se fixer sur la région 5'UTR *CFTR* (région entre le +1 de transcription et l'ATG). Des expériences de transfection avec des miARNs et des constructions contenant la séquence 5'UTR *CFTR* en amont de la séquence codante d'un gène rapporteur pourrait être envisagées. Le dosage de l'activité luciférase permettrait ainsi d'évaluer l'impact des miARNs sur cette séquence. Dans le cas où une différence d'activité luciférase serait observée, l'utilisation d'antimiRs pourrait être envisagée pour confirmer l'action du miARN identifié. Enfin, confirmer l'interaction physique entre les miARNs et le transcrit *CFTR* reste indispensable. Une approche de type TAP-Tar (*Tandem Affinity Purification of miRNA Target mRNAs*) ou RIP (*RNA Immunoprecipitation*) couplée à une immunoprécipitation des miARNs d'intérêt peut être envisagée.

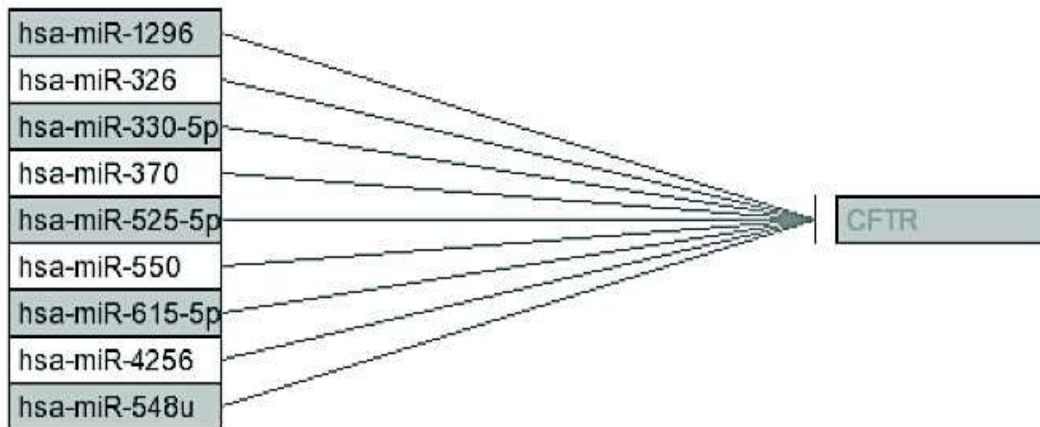


Figure 2 : Les différents miARNs pouvant potentiellement se fixer sur la région 5'UTR *CFTR* (prédictions miRTar).

D'autre part, des expériences de transfection *via* l'utilisation de vecteurs rapporteurs contenant la séquence codante du gène luciférase, sous contrôle de la région 3'UTR dégénérée au niveau de motifs ARE (*AU rich elements*), a permis de mettre en évidence la présence de quatre motifs déstabilisateurs (ARE-4585, ARE-5533, ARE-5698 et ARE-6074) et d'un motif stabilisateur (ARE-4760). Ce travail a également permis de montrer que l'action de miR-101 dépendait de l'intégrité de la séquence ARE-6074. De plus, des études ont montré que les motifs ARE pouvaient participer au recrutement de miARNs (Vasudevan *et al.* 2007). Ainsi, la prochaine étape serait de déterminer les protéines ARE-BP qui se fixent sur le motif ARE-6074 (RNA pull-down et spectrométrie de masse). L'action de miR-101 sur la région 3'UTR *CFTR* pourra ensuite être évaluée, après utilisation de siARNs dirigés contre les protéines ARE-BP identifiées. Le recrutement de ces protéines entre les tissus pulmonaires adultes et fœtaux pourra également être étudié. Enfin l'étude de ces facteurs après induction d'un stress cellulaire donnera de précieuses informations sur leur action en contexte pathologique.

Réseau de régulation entre les facteurs de transcription et les miARNs. Les miARNs régulent les gènes codant les facteurs de transcription et inversement, les facteurs de transcription régulent les gènes codant des miARNs (voir figure ci-dessous).

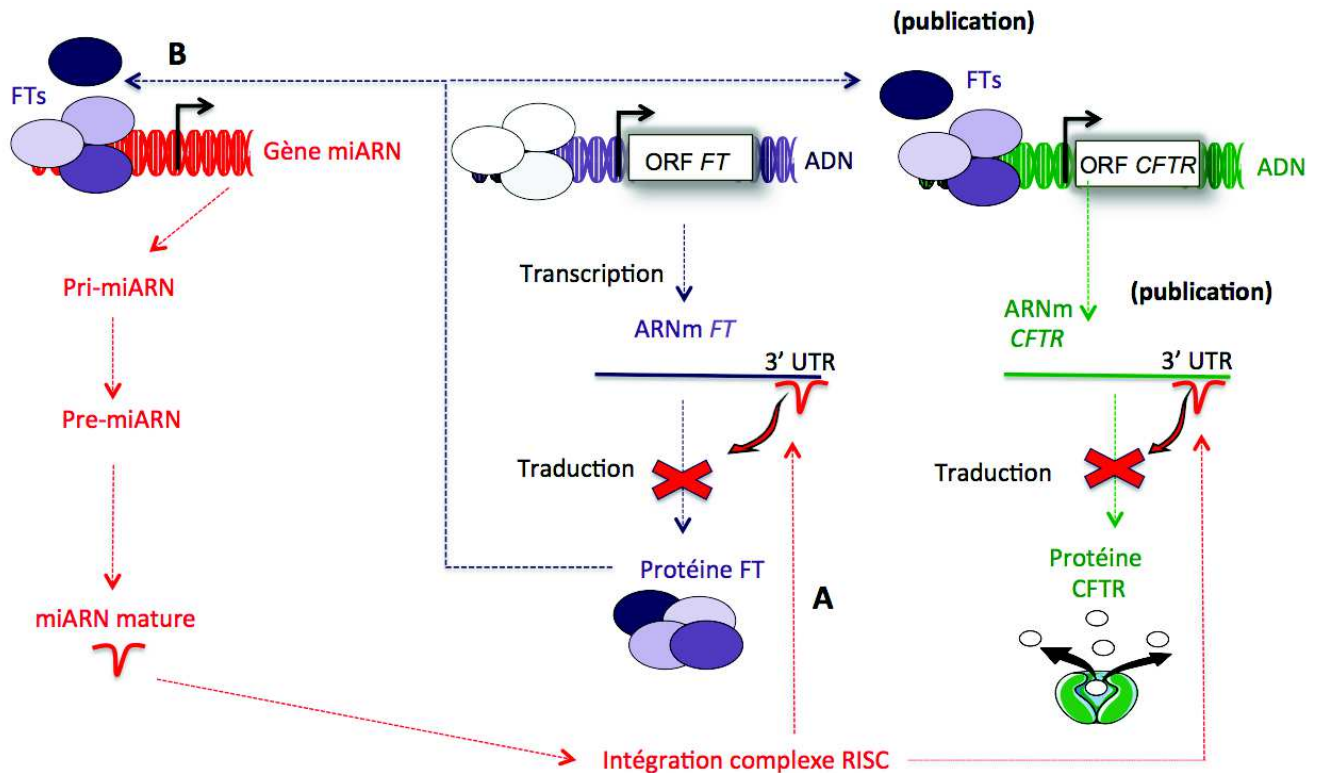


Figure 3 : Réseau de régulation entre le gène *CFTR*, les facteurs de transcription et les miARNs.

Les objectifs seraient d'évaluer l'impact :

→ Des miARNs, agissant sur l'ARNm *CFTR*, sur les transcrits des facteurs de transcription régulant la transcription du gène *CFTR* (voir figure 3, A). Certains activateurs ont un effet moins marqué dans les cultures pulmonaires issues de poumons matures que de poumons foetaux. Il serait intéressant de quantifier leur expression dans ces deux modèles. Ainsi, si une différence d'expression est observée, l'impact des miARNs prédits pour se lier et régulant le transcrit *CFTR*, pourra être évalué sur ces ARNm. En effet, les analyses de prédictions bioinformatiques indiquent que les transcrits codant certains facteurs de transcription, sont des cibles des miR-101 (voir tableau ci dessous).

Gène cibles de miR-101-3p	Site de fixation	Sites de prédiction		
		targetScan	picTar	RNA22
SRF	chr6:43148243-43148249[+]	x	x	x
FOXF1	chr16:86547505-86547511[+]	x		

Tableau 1 : Transcrits cibles de miR-101.

Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de miR-101 sur l'expression de ces facteurs de transcription par des expériences de gène rapporteur, ainsi que de quantifier le taux d'ARNm de ces facteurs après transfection du miARN.

→ Des facteurs de transcription qui régulent la transcription du gène *CFTR*, sur les promoteurs des miARNs agissant sur l'ARNm *CFTR* (voir figure 3, B). Les analyses bioinformatiques indiquent que les promoteurs des gènes de miARN contiennent des sites de fixation pour des facteurs participant à la régulation du gène *CFTR*. Par exemple la région promotrice de miR-101 (1000 pb en amont du TSS) comporte des motifs de fixation pour des facteurs FOXA2 (HNF-3 beta), CEBP, SOX17, et Nkx (prédictions Consite).

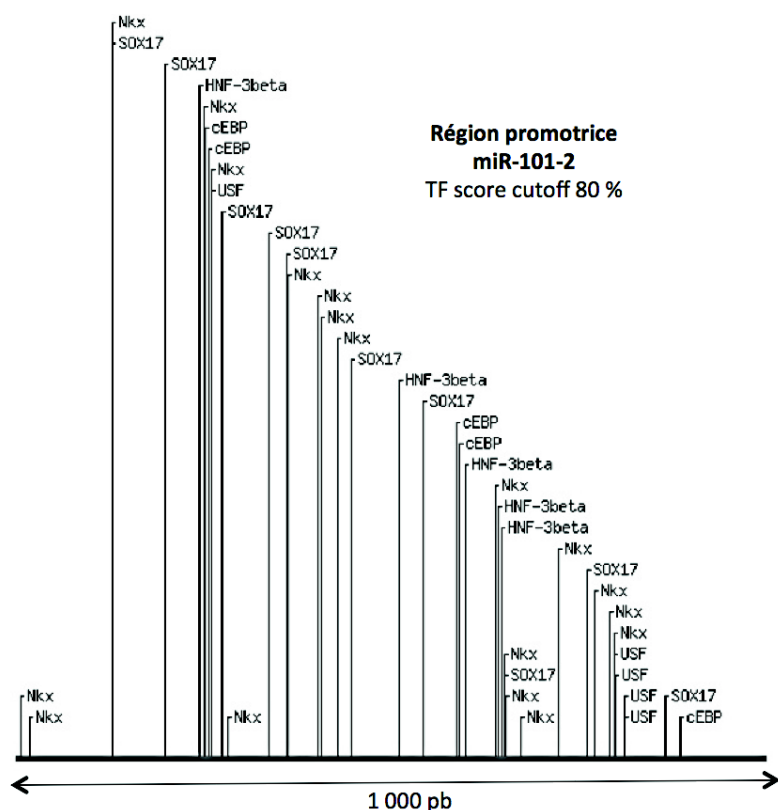


Figure 4 : Sites de fixation pour les facteurs de transcription sur la région promotrice de miR-101 (Prédiction Consite).

Evaluer l'impact de ces facteurs de transcription sur l'expression de miR-101 pourrait être pertinent pour la compréhension des mécanismes de régulation par ce miARN puisque une augmentation du taux de miR-101 dans le poumon mature a été identifiée.

En finalité, ces études pourraient permettre de réaliser l'ébauche d'un réseau de régulation autour du gène *CFTR*.

Utilisation d'oligonucléotides bloqueurs inhibant la fixation des miARNs sur la région 3'UTR CFTR. Après l'identification d'éléments *cis* et *trans*-régulateurs, l'étude s'est ensuite focalisée sur deux miARNs qui présentent un effet répressif et dont le taux endogène était significativement augmenté (RT-qPCR) dans les cellules issues de poumons matures comparé aux cultures issues de poumons fœtaux. Ainsi, les motifs de fixation de miR-101 et miR-145 sur la région 3'UTR *CFTR* ont été masqués à l'aide d'oligonucléotides bloqueurs (*MBBOs* : *MiRNA-Binding Blocker Oligonucleotides*) spécifiques au transcrite *CFTR*. Après avoir évalué leur efficacité dans des lignées cellulaires, un modèle *ex vivo* issu de curetage de cellules nasales de patients homozygotes pour la mutation p.Phe508del a été utilisé. Les épithéliums différenciés en interface air liquide (ALI, après 28 jours de différenciation), ont été traités pendant 2h au pôle apical par les molécules MBBO-1 et MBBO-3 ciblant ces 2 miARNs. Les ARNs et protéines ont été récupérés 24h et 48h après l'administration des bloqueurs. Les résultats indiquent que les MBBOs permettent dans les épithéliums reconstitués, d'augmenter la stabilité du transcrite *CFTR* et le taux de protéine CFTR p.Phe508del. L'avantage des MBBOs est qu'il s'agit de molécules spécifiques à la région 3'UTR *CFTR* contrairement aux anti-miRs, des molécules piégeant les miARNs libres dans le cytoplasme. En effet, un miARN a plusieurs cibles ce qui rend difficile l'utilisation des anti-miRs car ces molécules peuvent modifier simultanément plusieurs voies de signalisation. De plus, les miARNs miR-101 et miR-145 ont été décrits comme des suppresseurs de tumeurs dans le poumon (Cho *et al.* 2011, Yan *et al.* 2014, Chen *et al.* 2010, Yin *et al.* 2011). Au-delà d'inhiber leur action répressive sur le transcrite *CFTR*, le risque serait de réprimer des gènes essentiels au bon fonctionnement cellulaire. De plus, une autre étude a montré que l'introduction d'un mimic permettant d'augmenter l'expression de miR-138 est bénéfique pour la restauration du taux de protéine CFTR mais les auteurs précisent que ce type d'approche serait néfaste pour les cellules (Ramachandran *et al.* 2012). Ces exemples montrent l'importance d'utiliser une approche spécifique du gène *CFTR*. Le second avantage des MBBOs est que contrairement à la thérapie génique, ces molécules ne pénètrent pas dans le noyau puisque les miARNs agissent au

niveau cytoplasmique. Par ailleurs, un transcrit est la cible de plusieurs miARNs, ainsi une des perspectives est d'évaluer si la combinaison de plusieurs MBBOs permettrait d'améliorer leur efficacité. L'utilisation de MBBOs pourra également être testée en combinaison avec des correcteurs (Van Goor *et al.* 2011) et des potentiateurs (Van Goor *et al.* 2009) pour la mutation p.Phe508del. Les molécules utilisées contiennent des modifications de type LNA. Il serait ainsi intéressant d'envisager de tester et de comparer d'autres modifications ou une conjugaison avec des séquences lipidiques (une collaboration avec P. Barthelemy a été mise en place pour tester ce type de modifications). Enfin, la région 3'UTR comporte des motifs de fixation pour les miARNs et les ARE-BP. Un motif ARE a été caractérisé comme séquence déstabilisatrice. Le blocage de ce motif par des oligonucléotides bloqueurs constitue une nouvelle piste pour stabiliser seul ou en combinaison avec les MBBOs, le transcrit *CFTR*.

4.1.4. Autres résultats non publiés

Inhiber la fixation de miR-384 sur la région 3'UTR CFTR par l'utilisation d'un oligonucléotide bloqueur MBBO-4. Une molécule inhibant la fixation de miR-384 (MBBO-4) a également été testée sur les cellules CFBE41o- (**figure 5**) selon le même protocole utilisé pour l'étude de MBBO-1 et MBBO-3 (*voir publication*).

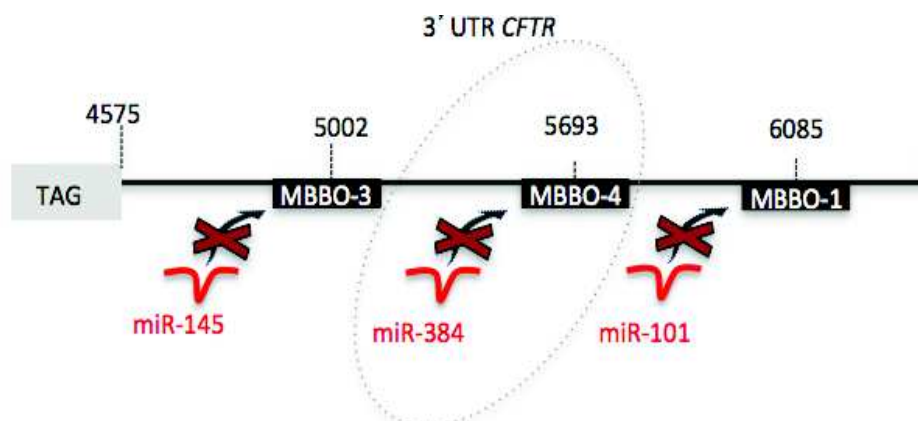


Figure 5 : Site de fixation de MBBO-4.

Les données indiquent que cette molécule augmente l'activité du canal CFTR. Comme l'illustre la **figure 6**, l'effet est plus marqué pour MBBO-4 (194%) que MBBO-1 (174%) et MBBO-3 (152 %).

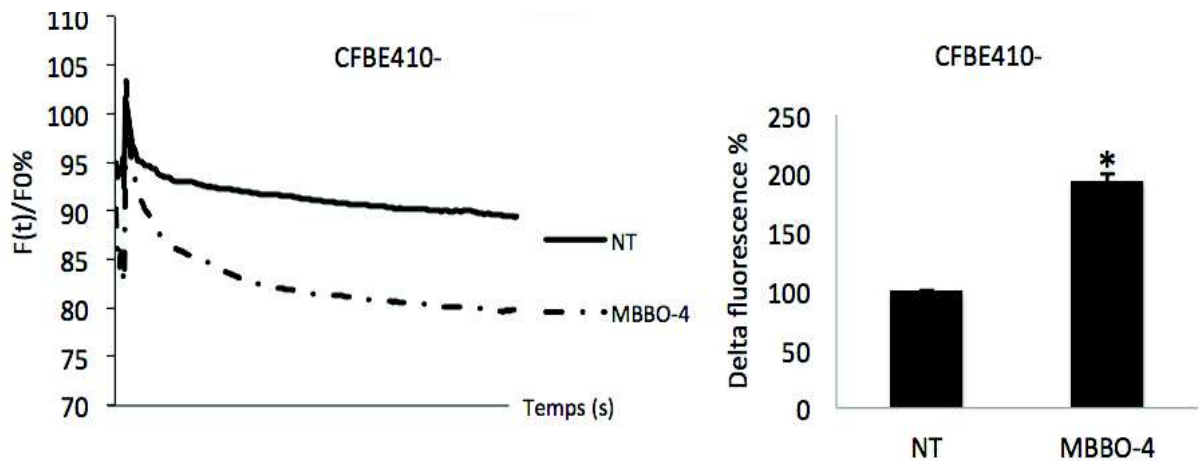


Figure 6 : Effet de MBBO-4 sur l'activité du canal CFTR dans les cellules CFBE410-.

Le graphique de gauche illustre la diminution de fluorescence observée au cours du temps. Plus le canal est actif, plus la fluorescence est faible. Le graphique de droite est une quantification des données obtenues sous forme d'histogramme. Résultats issus d'une collaboration avec O.Tabary.

La molécule MBBO-4 a également été testée sur l'épithélium d'un patient homozygote p.Phe508del selon le même protocole utilisé pour l'étude de MBBO-1 et MBBO-3 (*voir publication*). Les résultats montrent que cette molécule permet également d'augmenter la quantité de protéine CFTR (*voir figure 7*).

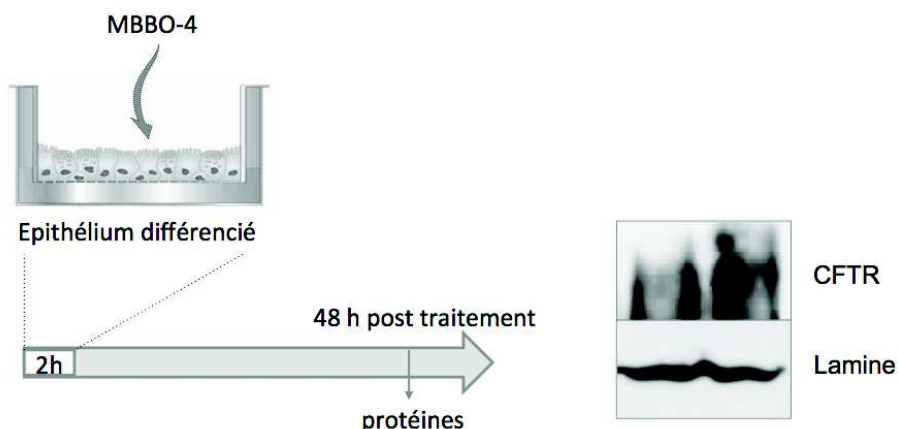
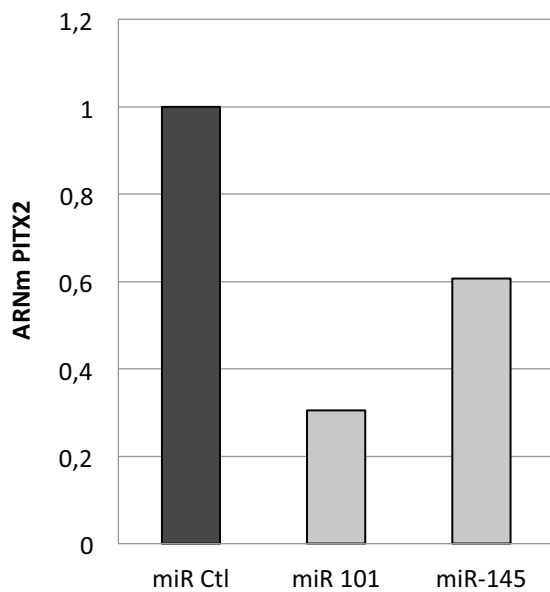


Figure 7 : Effet de la molécule MBBO-4 sur la quantité de protéines CFTR, après traitement d'un épithélium reconstitué en ALI issu d'un patient homozygote p.Phe508del.

Etude du rôle de miR-101 et miR-145 dans le poumon. La différence d'action de miR-101 et miR-145 sur le transcrit *CFTR* entre le poumon foetal et le poumon mature, est due à une différence de leur expression. En effet, miR-101 et miR-145 sont surexprimés dans des cultures pulmonaires adultes (A549) comparés à des cultures fœtales (HBEpiC, n=3). Toutefois, étant donné qu'un miARN a plusieurs cibles, l'étude du rôle de ces miARNs dans le poumon mature a été initiée. Pour cela, des cultures pulmonaires A549 ont été transfectées par les précurseurs de miR-101 et miR-145 (molécules Ambion). Après vérification de la surexpression de ces deux miARNs, un transcriptome a été réalisé. Les gènes les plus dérégulés ont été insérés dans la base de données KEGG afin de trouver une voie de signalisation commune. La voie qui semblait la plus touchée est la voie Wnt (données non montrées). Afin de valider l'action de ces deux miARNs sur la voie Wnt dans un modèle plus adapté que les cellules A549, ces deux miARNs ont été surexprimés ou sous-exprimés dans des cultures primaires bronchiques (obtenues par la société Epithélix). Après 24h de transfection (précurseurs ou antimiRs Ambion, 20nM), les ARNs ont été extraits. Après confirmation de l'effet des précurseurs et des antimiRs, les échantillons ARNs ont ensuite été rétrotranscrits puis testés sur une puce contenant des amorces spécifiques à cette voie de signalisation (Human WNT Signaling Pathway, RT2 Profiler PCR Array, 384 well, Cat. No.330213 PAHS-243ZA, Qiagen). Ces puces permettent d'analyser 84 gènes différents. Parmi les ARNm dérégulés par miR-101 et miR-145 se trouve l'ARNm *PITX2* (**voir figure 8**). Les précurseurs de ces deux miARNs diminuent l'expression du gène *PITX2* et à l'inverse, l'utilisation d'inhibiteurs (antimiRs) dirigés contre ces deux miARNs augmente l'expression de ce gène (**figure 8**).

Les résultats préliminaires indiquent une modulation du gène *PITX2* ($\Delta\Delta Ct$), impliqué dans l'asymétrie pulmonaire, par ces deux miARNs. Cependant les outils bioinformatiques ne prédisent pas que le transcrit *PITX2* soit une cible de ces deux ARN non codants suggérant une action indirecte. Néanmoins ces miARNs sont prédits pour moduler l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation des SMADs (**figure 9**).

A



B

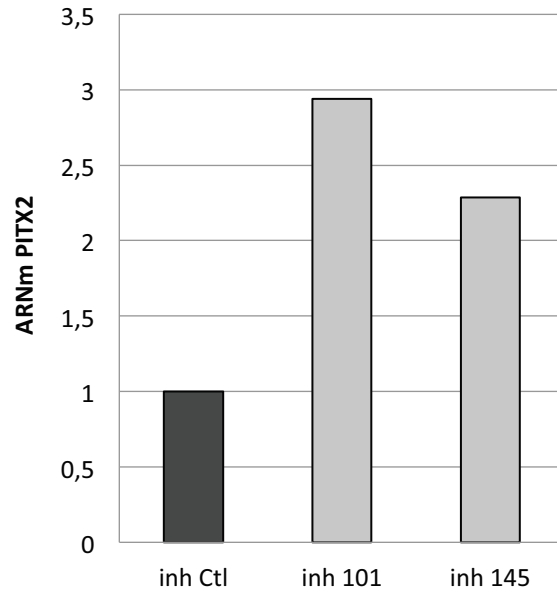


Figure 8 : Taux de transcrit *PITX2* après surexpression (A) et sous-expression (B) de miR-101 et miR-145. Résultats de RT-qPCR (utilisation d'une puce dédiée à la voie Wnt, cultures primaires bronchiques).

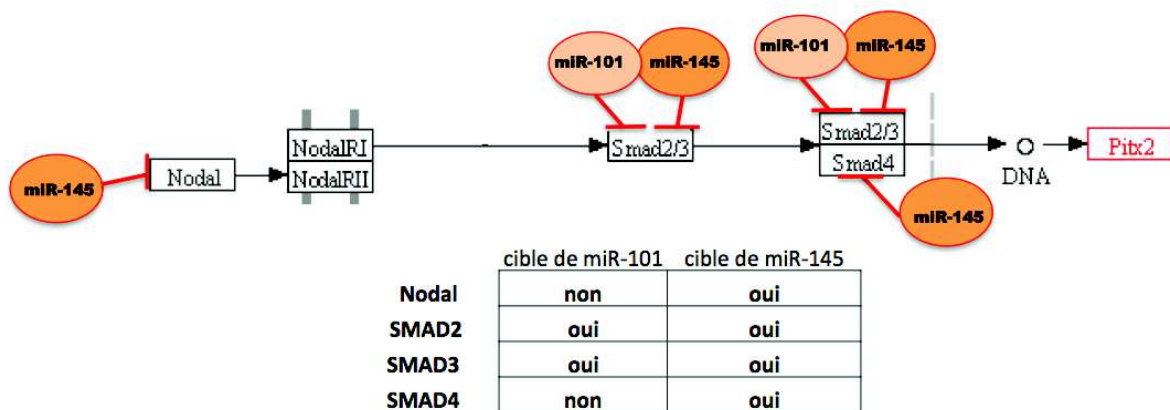


Figure 9 : Cibles de miR-101 et miR-145 (prédictions TargetScan et voie de signalisation issue de KEGG Pathway).

Il serait intéressant après confirmation de ces résultats, d'évaluer le niveau d'expression du gène *PITX2* dans les cultures fœtales et d'approfondir l'effet de miR-101 et miR-145 sur ce gène.

Pour conclure, définir les liens qui existent entre les régulateurs du gène *CFTR*, incluant les facteurs de transcription et les miARNs, reste essentiel pour poursuivre la compréhension des mécanismes de régulation de ce gène.

4.2. Article 2 : Small-scale high throughput sequencing-based identification of new therapeutic tools in cystic fibrosis

4.2.1. Contexte de l'étude

25 ans après la découverte du gène *CFTR*, plus de 2 000 altérations moléculaires sont référencées sur ce gène dans la base de données internationale (genet.sicckids) et la majorité d'entre elles sont rares ou privées. Chez les patients CF, la recherche de mutations est réalisée par l'utilisation de kits commerciaux permettant l'identification de mutations sévères déjà détectées. Lorsque les résultats ne permettent pas d'identifier les mutations responsables de la mucoviscidose, les laboratoires d'expertise explorent l'ensemble des exons ainsi que les jonctions exon-intron flanquantes (séquençage Sanger) ou recherchent la présence de grands réarrangements comme de grandes délétions, duplications ou insertions impliquant un ou plusieurs exons. Cependant, malgré l'étendu des techniques disponibles, pour certains patients présentant une mucoviscidose classique, les deux mutations causales de la pathologie restent non détectées. Le séquençage Sanger est une technique très sensible mais qui ne permet de séquencer qu'un nombre limité de bases (500pb), rendant difficile l'exploration de la totalité du gène *CFTR*. La taille de ce gène est d'environ 190kb et l'utilisation d'approche de séquençage de seconde génération est indispensable pour rechercher des mutations non encore identifiées dans des régions difficilement explorables par des approches classiques de type Sanger. A ce jour, encore 2 à 5% des mutations CF restent non détectées. Ce travail fait suite au recrutement de patients CF chez qui les 2 mutations sévères n'ont pas été identifiées. La recherche de mutations par une approche de séquençage de seconde génération, dans des régions non explorées incluant les régions non codantes 5', 3'UTR et les introns, a donc été envisagée.

Les objectifs principaux étaient :

→ L'étude comparative de deux approches d'amplification du locus *CFTR* (250 kb).

→ L'utilisation d'une stratégie d'analyse bioinformatique ("pipeline") permettant de cibler rapidement sur des mutations sévères.

→ La confirmation de nouvelles mutations introniques.

→ L'utilisation d'oligonucléotides pour corriger les défauts d'épissage induits par ces mutations introniques. L'objectif étant en finalité de tester ces outils thérapeutiques sur les cellules du patient.

4.2.2. Publication

Small-scale high-throughput sequencing–based identification of new therapeutic tools in cystic fibrosis

Jennifer Bonini^{1,2}, Jessica Varilh^{1,3}, Caroline Raynal, PharmD, PhD^{1,3}, Corinne Thèze^{1,3}, Emmanuelle Beyne, PhD^{1,3}, Marie-Pierre Audrezet, PhD⁴, Claude Ferec, MD, PhD⁴, Thierry Bienvenu, MD, PhD⁵, Emmanuelle Girodon, MD, PhD⁵, Sylvie Tuffery-Giraud, PhD^{1,2}, Marie Des Georges, PharmD^{1,3}, Mireille Claustres, MD, PhD^{1,2} and Magali Taulan-Cadars, PhD^{1,2}

Purpose: Although 97–99% of *CFTR* mutations have been identified, great efforts must be made to detect yet-unidentified mutations.

Methods: We developed a small-scale next-generation sequencing approach for reliably and quickly scanning the entire gene, including noncoding regions, to identify new mutations. We applied this approach to 18 samples from patients suffering from cystic fibrosis (CF) in whom only one mutation had hitherto been identified.

Results: Using an in-house bioinformatics pipeline, we could rapidly identify a second disease-causing *CFTR* mutation for 16 of 18 samples. Of them, c.1680-883A>G was found in three unrelated CF patients. Analysis of minigenes and patients' transcripts showed that this mutation results in aberrantly spliced transcripts because of the inclusion of a pseudoexon. It is located only three base pairs from

the c.1680-886A>G mutation (1811+1.6kbA>G), the fourth most frequent mutation in southwestern Europe. We next tested the effect of antisense oligonucleotides targeting splice sites on these two mutations on pseudoexon skipping. Oligonucleotide transfection resulted in the restoration of the full-length, in-frame *CFTR* transcript, demonstrating the effect of antisense oligonucleotide-induced pseudoexon skipping in CF.

Conclusion: Our data confirm the importance of analyzing non-coding regions to find unidentified mutations, which is essential to designing targeted therapeutic approaches.

Genet Med advance online publication 8 January 2015

Key Words: antisense oligonucleotides; cystic fibrosis; intronic mutation; next-generation sequencing; pseudoexon skipping

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a common autosomal recessive disorder caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. This gene displays great mutational heterogeneity, depending on the ethnic and phenotypic background, with almost 2,000 *CFTR* alterations referenced (*genet.sickkids.on.ca*). Identification of disease-causing mutations has been of particular importance, not only for diagnosis but also in the recent era of therapeutic approaches targeted to genetic defects. Of the reported *CFTR* mutations, more than 200 are classified as splicing alterations. About 60% of them affect the canonical GT/AG dinucleotides that form the consensus sequences of donor and acceptor splice sites (ss). Mutations in deep introns are poorly referenced. Among them, three (c.3718-2477C>T in intron 22 (3849+10kbC>T), c.1680-886A>G in intron 12 (1811+1.6kbA>G), and c.870-1113-870-1110delGAAT in intron 7) are severe mutations that cause cryptic exon inclusion.¹⁻⁴

Currently, 2–5% of CF mutations remain unknown and are probably located deep in introns, inducing aberrant splicing events. Because of technical difficulties of using the classic

Sanger method (a labor-intensive and time-consuming task) to sequence entire genes, intron analysis has been quite limited, and thus the identification of these remaining mutations is challenging.

The development of next-generation sequencing (NGS) technologies with an immense capacity (up to 600 Gb per run) represents major progress in human genetics. Whole-genome and exome sequencing are becoming popular approaches, and exome sequencing can be a powerful tool to identify the molecular basis of monogenic diseases.^{5,6} By allowing the rapid sequencing of a considerable number of samples,^{7,8} these methods have provided precious sequence data that are collected in reference data sets. Each NGS platform generates different read lengths that range from short reads (e.g., 35 bases) to reads longer than 500 bases. For a number of applications, including targeted resequencing, chromatin immunoprecipitation sequencing, and RNA sequencing, short reads are highly informative and adequate. Conversely, longer reads are more suitable for assembling de novo genomes, mapping highly-homologous regions (related gene family and pseudogenes), and sequencing repetitive DNA regions, such as introns.

The first two authors contributed equally to this work.

¹INSERM U827, Laboratoire de Génétique de Maladies Rares, Montpellier, France; ²Université Montpellier I, UFR de Médecine, Montpellier, France; ³Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Montpellier, Montpellier, France; ⁴Laboratoire de Génétique Moléculaire et d'Histocompatibilité, CHRU, Brest, France; ⁵AP-HP, Service de Biochimie et Génétique Moléculaires, Groupe Hospitalier Cochin Broca Hôtel Dieu, Paris, France. Correspondence: Magali Taulan-Cadars (magali.taulan@inserm.fr)

Submitted 9 September 2014; accepted 24 November 2014; advance online publication 8 January 2015. doi:10.1038/gim.2014.194

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

BONINI et al | High-throughput sequencing-based identification of new therapeutic tools in CF

Despite their promises, NGS technologies have significant limitations: high error rates, enrichment of rare variants, and a large proportion of missing values, as well as the fact that most current analytical methods are designed for population-based association studies. Indeed, because NGS produces massive amounts of data, their analysis and interpretation are time consuming, not trivial, and a real challenge. Therefore, the complex and time-consuming “postsequencing” data analysis currently limits the application of high-throughput NGS technologies in most laboratories. If specific portions of a genome need to be analyzed, targeted enrichment (by hybrid capture, circularization, or polymerase chain reaction (PCR)) can be useful. For instance, two recent publications described a strategy for resequencing the *CFTR* gene

in patient samples harboring previously characterized *CFTR* mutations and polymorphisms.^{9,10}

Thus the first aim of this study was to develop a robust approach for fast and efficient resequencing of the whole *CFTR* gene to identify new, as-yet unidentified mutations by using any small-scale NGS sequencing platform. To this aim, we compared two target-enrichment techniques (hybrid capture and long-range PCR (LR-PCR)) and developed an “in-house” pipeline for easy postsequencing data analysis of a CF patient and his parents to identify unknown pathogenic *CFTR* variants. This pipeline then was applied to 17 samples from CF patients in whom only one mutation had hitherto been identified. The combination of bioinformatics analysis and experimental validation led to the identification of

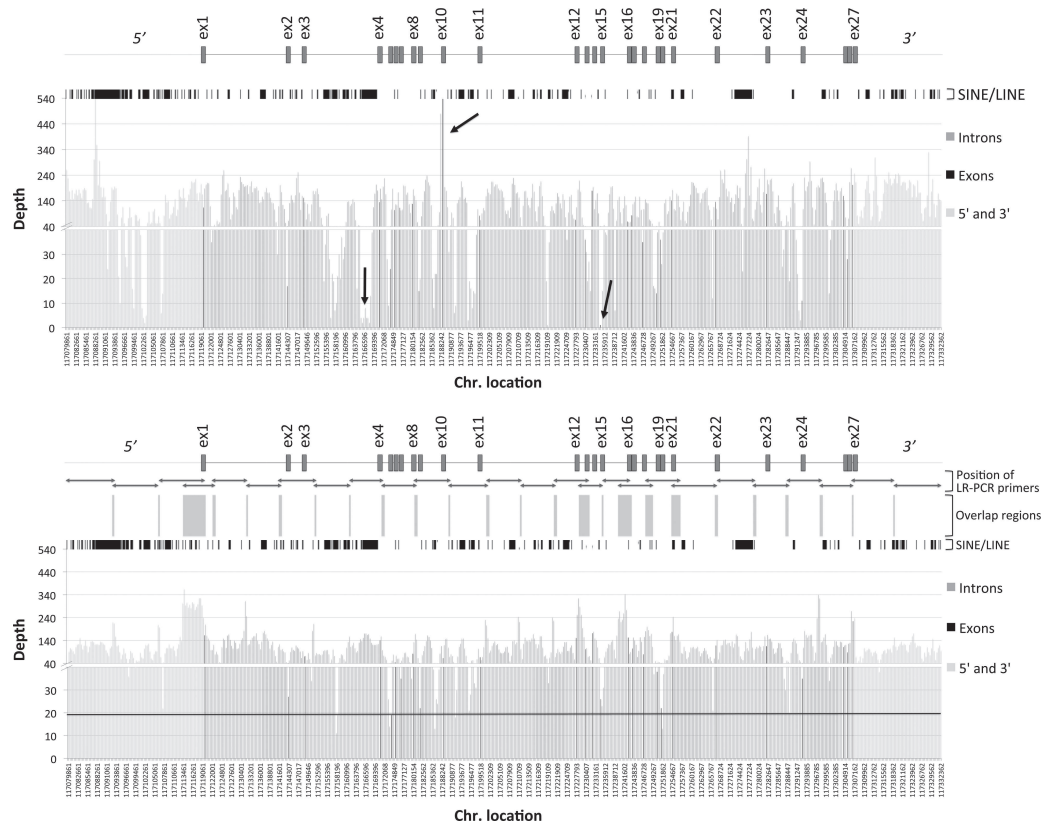


Figure 1 Graphic representation of the sequencing coverage/depth of the father's DNA sample after hybrid capture and long-range polymerase chain reaction (LR-PCR) enrichment (mapping to chromosome 7). (a) The whole *CFTR* locus was split into 400-bp fragments and then compared with the sequencing data. The *CFTR* flanking regions are in light gray, intronic regions in gray, and exons in black. SINES/LINES are shown in black at the top of the graphic representation. The three arrows highlight a region with excess coverage (exon 10, duplicated region) and two regions with low coverage (intron 3 and exon 15). (b) The whole *CFTR* locus sequence after LR-PCR enrichment. The position of the LR-PCR primers and overlapping regions, which often were oversequenced, are shown on top LINE, long interspersed nuclear element; SINE, short interspersed nuclear element.

a new mutation in three unrelated patients with classic CF and a single known mutation.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

DNA was extracted from lymphocytes of peripheral blood samples from 18 unrelated patients with CF using standard protocols. All patients had classic CF (with a sweat chloride test result >60 mEq/l) and a single known mutation. All samples studied in this work had previously undergone conventional *CFTR* screening to scan exons and flanking junctions and to search for large rearrangements.

To simplify data processing we present only results from samples extracted from one CF patient and his parents (a family trio study). Written informed consent for *CFTR* studies was obtained.

Sequencing protocol

Detailed protocols on the GS Junior Sequencer (454 Life Technologies, Brandford, CT) are available in the **Supplementary Materials** online.

In silico analysis

Detailed protocols based on previous data,¹¹ and algorithms defined by different studies¹²⁻¹⁶ are available in the **Supplementary Materials** online.

Functional studies: splicing reporter constructs

The impact of the newly discovered variant on splicing was tested as previously described;¹⁷ specific information on the constructs is available in the **Supplementary Materials** online.

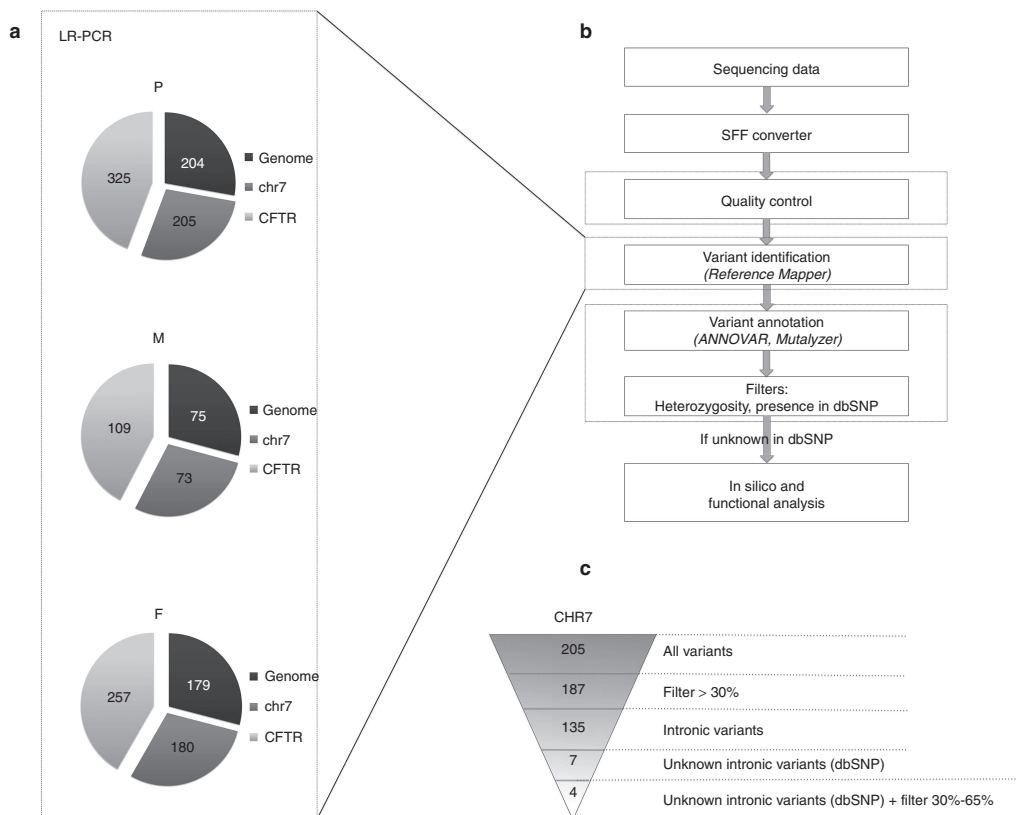


Figure 2 Variant mapping, in-house pipeline, and variant identification. (a) Circular diagrams showing the number of variants found after alignment (hg19) to the entire human genome (genome), chromosome 7 (*chr7*), or *CFTR* as the reference. The number of variants depends on the mapping reference. F, father; M, mother; P, patient. (b) In-house pipeline for variant identification based on the local Web-based Galaxy platform (dotted box). Variant annotation is implemented with in-house Perl modules. Heterozygosity (threshold fixed at 30–65%) and dbSNP filtering were applied to all variants extracted after annotation using Annotvar and Mutalyzer. (c) The pipeline was used to analyze the variants identified in the patient's sample. The results shown in **a** and **c** correspond to data generated by long-range polymerase chain reaction enrichment.

France). Cells were harvested after 48 h for transcript analysis. For target site blocker (TSB) treatment (European Patent application number EP13306250.5), cells were cotransfected with the *CFTR* minigene constructs and 25, 50, and 100 nmol/l or 1 μ mol/l TSB using the Interferin transfection reagent (Polyplus; Ozyme, Illkirch, France).

Transcript analysis. Total RNA was extracted from BEAS-2B cells using the RNeasy Plus kit (Qiagen). At least two independent transfections were carried out for all experimental conditions. The impact on splicing was tested, as previously reported.¹⁷ The reverse transcriptase PCR products also were sequenced using the Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/Life Technologies, St Aubin, France) on an ABI-3130XL Genetic Analyzer. The relative amount of each *CFTR* splicing product was determined by measuring the peak area (evaluated by GeneMapper software) and dividing it by the sum of all peak areas detected in the same PCR reaction.

Total RNA was extracted from the patient's nasal cells and from two controls without CF using the RNeasy Plus kit (Qiagen). Reverse transcription was produced from 500 ng of total RNA with the M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). One microliter of each reverse transcriptase product was used for PCR amplification with primers encompassing intron 12 (f11-r13) and specific primer pairs amplifying a pseudoexon (PE) (f11-rPE). Details are available in the **Supplementary Materials** online.

Nomenclature

We used the international nomenclature recommended by the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>), in accordance with the *CFTR* gene numbering in which nucleotide +1 in the coding DNA reference sequence (GenBank NM_00492.3) corresponds to the A of the ATG translation initiation codon. For convenience, the legacy name of previously described mutations was added in parentheses.

RESULTS

Sequencing and coverage

To test our approach for small-scale NGS projects, after enrichment by hybrid capture or LR-PCR, we sequenced the entire *CFTR* locus on chromosome 7q32 in 18 CF samples. In all samples and on average, we found 95% of coverage for the capture

and 98% for the LR-PCR, with depth up to 10 \times . Under 10 \times , we considered the reads as artifacts, that is, problems of sequencing. For the LR-PCR, the remaining 2% are probably due to problems in sequencing, as no uncovered region is common between the patients. The details of the runs for one CF patient and his parents (in family trio studies, the parents serve as controls to filter out benign variants and establish the pipeline) are summarized in **Supplementary Table S1** online. On average, on the complete gene, the mean depth of coverage varied from 50 \times to 112 \times (44–113 \times for exons, 54–118 \times for introns, and 74–152 \times for gene regions, including 5' untranslated region (UTR) and 3' UTR sequences) with both methods (**Supplementary Table S2** online). Because the father's DNA from the family trio study was associated with the lowest number of reads, we present his DNA to show that this amount of reads was sufficient to obtain informative sequence data.

Hybrid capture versus LR-PCR enrichment

To compare the *CFTR* gene coverage generated using the two target enrichment approaches, data were processed using the in-house pipeline (in Galaxy) to visualize all reads for the *CFTR* gene. Globally, these data helped us to verify whether the absence of variants in some regions in this patient was due to sequencing problems (**Figure 1**). First, we observed the presence of large sequencing gaps, particularly with the hybrid capture method, shown in **Figure 1a** (composition of the entire *CFTR* gene is also shown in **Supplementary Figure S1** online). Second, we observed a high peak encompassing exon 10 (arrow in **Figure 1a**) following hybrid capture, but not after LR-PCR enrichment (**Figure 1b**). Analysis of human *CFTR* exon 10 and its flanking regions using the Basic Local Alignment Search Tool revealed a duplication of the region 117,188,495–117,189,477, as previously reported in a study that focused on exon 10 (PEs located on chromosomes 9, 12, and 20).¹⁹ Alignment of reads against the entire genome as reference, rather than against *CFTR* or chromosome 7, improved the problem of alignment of pseudogenes.

Data comparison (**Figure 1a,b**) showed that the LR-PCR enrichment method improved the coverage, with more homogeneous coverage despite higher depth at overlapping regions. The poorly covered 4.3-kbp region in intron 3 (chr7:117,165,300–117,169,577; arrow in **Figure 1a**), which was not amplified by the capture method, was correctly amplified by LR-PCR (**Figure 1b**). In addition, exon 15, which

Figure 3 Identification of a putative intronic mutation. (a) Schematic representation of the *CFTR* region that contains the c.1680-883A>G mutation showing the pseudoexon (53 bp) included in the patient's sequence, as suggested by in silico analysis. Asterisks indicate the position of the wild-type and mutant nucleotides. The numbers in the white boxes indicate the scores for the corresponding 5' and 3' splice sites obtained using different bioinformatics tools. Theoretically, the mutation strengthens a 5' donor splice site (+12% with Human Splicing Finder, +83.6% with MaxEnt, +58% with Fsplice, and +49% with Automated Splice Site and Exon Definition Analysis), leading to the inclusion of a cryptic exon. (b) Phylogenetic analysis of the potential exon cryptic region by Multiz Alignment (UCSC Genome Browser). Nucleotide c.1680-883 is conserved in primates. (c) Sequence logo of the mutated region. Among the various species, nucleotide c.1680-883 is less conserved as compared with the juxtaposed donor site. (d) Aberrant splicing induced by the newly identified intronic mutation by splicing minigene assay. Wild-type (intron 12 wt) or mutant minigenes (c.1680-883A>G, c.1680-886A>G as positive control, and c.1680-870T>A as negative control) were transiently transfected in bronchial BEAS-2B cells. RNA was isolated and analyzed by reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR) using minigene-specific primers. PCR products were then analyzed by agarose gel electrophoresis (left panel). The lower band represents the correctly spliced exons, whereas the upper band represents the pseudoexon inserted between the minigene exons. The right panels show the sequence of the splicing products (Sanger method). (e and f) Aberrant splicing induced by the newly identified intronic mutation by RT-PCR on nasal cells from CF patients and two control samples. PCR amplifications were done with f11-r13, which amplifies (e) the normal transcript, or with f11-rPE, which specifically amplified (f) the cryptic exon. CEI, cryptic exon inclusion.

11–14 reads. For instance, sequencing of region 117,173,740–117,174,800, which contains only 24.5% GC (**Supplementary Figure S1b** online, panel 4), remained difficult, whatever the enrichment method used. In addition, 454 programs failed to correctly align homopolymers, including the well-known IVS9-poly(TG)mT(n) at the 5' end of exon 10 (5' end of exon 9 with legacy nomenclature) on the *CFTR* gene. Because we obtained 35,000 reads, at least for the father, using LR-PCR, we deduced that this read number per run is the cutoff to cover the majority of the 250 kb of the *CFTR* locus with 40× coverage; this was based on the family trio study and confirmed in the 17 other CF samples.

Influence of mapping choice in sequence variant identification

To facilitate data processing, we showed only the data from the trio previously studied. Using the sequencing data obtained after LR-PCR amplification, we next checked whether the number of *CFTR* variants depends on the reference used (the *CFTR* gene, chromosome 7, or the entire human genome) (**Figure 2a**). When reads were aligned against *CFTR* as reference, we identified, on average, 325 (patient), 109 (mother), and 257 (father) variants (**Figure 2a**). When we compared the alignments using chromosome 7 or the entire human genome as the reference, the number of identified variants varied. By analyzing the DNA composition of all identified variants, we noted that 82.4% of the variants in the patient's sequence that had been found only when using the *CFTR* reference (not chromosome 7 or the entire human genome) were located in short interspersed nuclear element/long interspersed nuclear element repeats. This suggests that using the *CFTR* gene sequence as the reference forced the alignment of reads located in short interspersed nuclear element/long interspersed nuclear element regions, thus explaining the difference in the variant number found with the three references (**Figure 2a**). We thus decided to use chromosome 7 as the reference for mapping with LR-PCR enrichment. When using a hybrid capture system, human genome mapping must be considered to avoid the alignment of potential PEs. In addition, because most (96%) of the common variants (both after hybrid capture and LR-PCR enrichment) found using alignment against the different references had 30% read support (i.e., for a given variant, 30 of 100 reads included the nucleotide change), we fixed this threshold as a filter of heterozygosity. Thus, variants

were considered as heterozygous when the read support was 30–65% and as homozygous when it was >70%. These filters have been validated on the 17 other CF samples.

Sequence variant identification

To facilitate the data and in silico analyses, we generated a workflow based on the family trio studies (**Figure 2b**). This pipeline is partially implemented in our local Galaxy Web-based platform with in-house Perl scripts. Using LR-PCR (and chromosome 7 as the reference for mapping), the detected variants included point mutations and small insertions/deletions. Among the 205 identified variants (**Figure 2c**), 42 were located in the 5' UTR (117,079,912–117,120,149), 10 in the 3' UTR (117,307,162–117,332,742), 2 in exons (previously identified by Sanger sequencing as non-disease causing variants), and 151 in introns. The previously reported variants detected with the Sanger method (four variants including p.Phe508del and five variants of repeat sequences corresponding to one polypyrimidine tract and four microsatellites) were all validated, with the exception of two microsatellites and the polypyrimidine tract. Indeed, one significant limitation of pyrosequencing is its apparent inability to correctly determine the number of bases within a homopolymeric stretch.²⁰ Among the 151 intronic variants identified, 135 had a read support higher than 30%. Seven of these 135 intronic variants were not referenced in the dbSNP site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), and only four had a read support between 30 and 65% and were thus heterozygous (the heterozygosity filter was fixed between 30 and 65%). In silico analysis was used next to predict the deleterious effect on splicing of each variant unreference in the dbSNP site. We then applied this workflow to the other CF samples, identifying only one mutation.

Application of the pipeline to the 18 CF samples

Considering all the CF DNA and before filtering, 197 variants in the *CFTR* gene per sample, on average, were detected, with 118 variants (filter >30%) found in introns. On average, we thus detected 4.6 variants per intron, with lengths ranging from 512 to 28,084 bp (in other words, 0.65 variants/1,000 bp). The pipeline allowed the detection of a potential second CF mutation in 16 samples and was inconclusive for 2. For 2 of 16 samples, the second mutation had not been previously identified because the DNA samples are related to old cases not processed by all conventional strategies, c.2875delG (3007delG, exon 17) and c.870-1113_1110delGAAT (a deep intronic mutation previously

Figure 4 Correction of aberrant splicing in bronchial cells by target site blockers (TSBs). (a) *CFTR* pre-messenger RNA fragment that contains the 53-bp pseudoexon harboring the newly identified c.1680-883A>G mutation (top) and the 49-bp pseudoexon harboring the c.1680-886A>G mutation (bottom). TSBs that target the splicing acceptor site (3' splice site) and splicing donor site (5' splice site) are above the sequence. (b and d) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of total RNA from bronchial BEAS-2B cells was performed using specific primers to analyze splicing after cotransfection of wild-type (IVS12 wt) or mutant (c.1680-883A>G, c.1680-886A>G) minigenes and TSBs. CEI, cryptic exon inclusion; WT, wild-type transcript. (b) Effect of TSB concentration on aberrant splicing. Cells were transfected with different TSB1 concentrations (25, 50, 100, and 1,000 nmol/l) for 24 h. (d) Effect of incubation time (24, 48, and 72 h) on splicing correction using 50 nmol/l TSB1. TSB1 specificity was confirmed using a control TSB (CTL) at the different concentrations tested and in combination with wild-type and mutant minigenes; to avoid overloading the figure, only the assays at 50 nmol/l or 24 h are shown. (c and e) Quantification of CEI and WT transcripts after transfection of TSBs at (c) different concentrations or at (e) different time points after transfection. RT-PCR was performed using a fluorescein amidite (FAM)-labeled forward primer located within the splice donor exon and a reverse primer within the splice acceptor exon of the pSPL3 plasmid. Quantification (noted as a percentage) was performed by dividing the area of the CEI peak by the area of all peaks (wild-type + CEI). Data correspond to the mean value of at least two independent experiments.

described²). In addition to the workflow, in silico tests predicted aberrant splicing for an additional 14 samples. A single, new, deep intronic mutation—c.1680-883A>G—was found in three unrelated patients. For one of them, the parents' DNA samples were also available; a familial segregation study was performed, revealing that the c.1680-883A>G intronic variant found in the patient (61%, 129×) was also present in the mother (44%, 108×). In the same family, allelic segregation thus confirmed that the new mutation was in trans of c.1521_1523del (p.Phe508del with 54% of the aligned sequences in the index case carrying this mutation; depth of 24×), as inherited from the father (p.Phe508del found at 35%, 41×).

Identification of a new, putative disease-causing mutation

To explore the effect of c.1680-883A>G (located in intron 12; chromosome location: 117,229,524; hg19), donor (5' ss) and acceptor site (3' ss) in silico predictions were generated for the mutated sequence (Figure 3a). The mutation generated a new, high-score 5' ss in intron 12, suggesting that this site could be used for alternative splicing. The newly identified, putative disease-causing mutation c.1680-883A>G is three nucleotides away from a well-known splice mutation (c.1680-886A>G (1811+1,6kbA>G)) that creates a donor site, causing the inclusion of a PE in mature transcripts.

To assess the putative functional importance of the new variant, a large-scale comparison of the orthologous CFTR intron 12 region from several mammalian species representing the Primate, Artiodactylia, and Lagomorpha orders (including 46 vertebrates and 9 primates; Figure 3b) was carried out using the UCSC Multiz alignment tool. This comparison revealed that nucleotide A at position c.1680-883 was remarkably conserved among primates and poorly conserved in the other species, including placental mammals (mouse, dog, rat, rabbit, pig, cow, sheep, and squirrel) (Figure 3b,c). Then the same locus was compared in selected orthologous genes using ClustalW2. The T nucleotide of the cryptic 5' ss was conserved in all studied species (90%); the G nucleotides of the cryptic 5' ss and at position c.1680-883 (black arrow in Figure 3c) were conserved (54 and 46%, respectively). Based on the results of the in silico analysis, this nucleotide variant

could be considered as a disease-causing mutation through the inclusion of a PE. In other respects, the mutation was tested in 200 control chromosomes by Sanger sequencing analysis and was not found.

Confirmation of the c.1680-883A>G intronic mutation using a splicing reporter assay and in nasal cells of a patient

We next used a splicing reporter assay to test the impact of the c.1680-883A>G variant on splicing (Figure 3d). When BEAS-2B cells were transfected with the minigene carrying the c.1680-886A>G variant (used as a positive control), which causes the inclusion of a 49-bp intronic sequence (cryptic exon inclusion), aberrantly spliced transcripts were ~90–95% of the total CFTR products (wild type and aberrantly spliced). Conversely, transfection of the minigene carrying the neutral variant c.1680-870T>A (negative control) did not have any effect on splicing. Finally, transfection of the minigene carrying the newly identified c.1680-883A>G mutation led to activation of a PE, resulting in the inclusion of an additional 53-bp sequence, as shown by Sanger sequencing, and a complete loss of the wild-type CFTR products.

We next checked whether this mutation retained the sequence in nasal cells from the CF patient included in the family trio analysis. Thus, we confirmed that, compared with controls, the patient harbored a 53-bp PE inclusion in intron 12 by PCR amplification using nonspecific and specific primers pairs to the PE (f11-r13 and f11-rPE, respectively) (Figure 3e,f).

Correction of CFTR aberrant splicing by using TSBs

We designed antisense oligonucleotides (TSB1 and TSB2) that block access to the 3' ss (acceptor site) and 5' ss (donor site), respectively (Figure 4a), in order to correct aberrant splicing caused by the c.1680-883A>G and c.1680-886A>G mutations. To determine the effect of TSB concentration on aberrant splicing, human bronchial BEAS-2B cells were cotransfected with the minigenes harboring the two mutations and four different TSB concentrations (25, 50, and 100 nmol/l, and 1 μmol/l) for 24 h. At a low concentration (50 nmol/l), TSB1, which targets the 3' ss (acceptor site), had a marked corrective effect on aberrant splicing caused by the c.1680-883A>G and

Table 1 In silico predictions for the 10 new putative disease-causing mutations

Variants	MaxEnt	HSF	Software		
			NNSplice	ASSEDA	Fsplice
c.53+3158A>G					
c.274-2354A>C					
c.1209+2330A>G					
c.1393-2734G>A					
c.1393-2883G>A					
c.1393-2921G>A					
c.1680-883A>G					
c.2989-313A>T					
c.3874-4522A>G					
c.3469-1304C>G					

Gray cells indicate noted variants with deleterious impact predicted by different programs.

ASSEDA, Automated Splice Site and Exon Definition Analysis; HSF, Human Splicing Finder.

c.1680-886A>G mutations (Figure 4b, upper and lower panel, respectively). TSB1 specificity was confirmed using a TSB control. The efficiency of wild-type splicing restoration was quantified by fragment analysis PCR (Figure 4c). TSB2 required a higher concentration to act on splicing (Supplementary Figure S2a online). We next performed time course experiments by transfecting 50 nmol/l TSB1 and harvesting cells after 24, 48, and 72 h. A marked effect was evident after 24 h (Figure 4d). Specifically, quantification showed that the percentage of aberrantly spliced transcripts (containing the cryptic exon) was reduced to 45% (c.1680-883A>G) and to 30% (c.1680-886A>G) of the total *CFTR* messenger RNA (mRNA) (wild-type and aberrantly spliced transcripts). Thus, transfection of 50 nmol/l TSB1 for 24 h induced a restoration of 55 and 70% of normal *CFTR* mRNA, respectively (Figure 4e). Finally, we assessed the duration of action of both TSBs in BEAS-2B cells and found that they had a strong effect on splicing up to 72 h after washing off the transfection medium (16 h of incubation) (Supplementary Figure S2b online). Partial restoration of correctly spliced *CFTR* mRNA induced by TSB1 (24 h at 100 nmol/l) was confirmed in primary nasal cultures obtained from a control individual (Supplementary Figure S2c online).

DISCUSSION

Although the majority of disease-causing mutations are typically found in the coding region or in canonical ss, a number of mutations also occur in noncoding regions. The value of NGS for whole-genome or exome sequencing for the identification of mutations in common and rare disease is now recognized.^{5,6} In the case of monogenic Mendelian diseases caused by mutations in a single, well-defined gene, however, sequencing this single gene, rather than the entire genome or exome, could be sufficient and also less expensive. Indeed, the combination of target enrichment and NGS now offers the possibility to perform such analyses in a time-efficient and economical way. In CF, great efforts to identify new modifier genes^{21–23} that influence disease severity have been made, but analysis of *CFTR* intronic sequences has been neglected.

Comprehensive sequence information on the entire gene locus can help identify a disease-causing mutation and avoid interpretation errors due to repeated sequences, PEs,²⁴ and pseudo-mutations.¹⁹ Recent publications reported *CFTR* resequencing by targeting exon and intron flanking sequences using the IonTorrent sequencer or by exploring the complete gene (custom NimbleGen SeqCap EZ Choice array) using HiSeq2000 in a selected set of 92 DNA samples; however, these studies focused only on previously characterized *CFTR* mutations and polymorphisms.⁹ No data about the robustness of *CFTR* resequencing for finding new mutations in yet unexplored regions have been published.

As proof of concept, we sequenced 18 samples from CF patients with a single known CF-causing mutation. We blindly applied the automated “in-house” pipeline implemented in Galaxy (prioritization strategy) that allowed the rapid identification of previously detected mutations (by conventional

approaches). This prioritization strategy is based on a comparison of the data obtained by hybrid capture or LR-PCR enrichment, and the read mapping against *CFTR* and chromosome 7, and application of a heterozygosity filter (30–65%), familial segregation (when possible), and dbSNP interrogation. The pipeline first maps the sequence being studied against chromosome 7 as a reference. Sequence analysis indicates that enrichment by multiple LR-PCR amplification (when possible) was better than hybrid capture for resequencing the complete gene. We found a putative second mutation for 16 of 18 tested DNA samples, including the new c.1680-883A>G mutation, identified in 3 unrelated patients. For the remaining samples, functional studies to confirm the deleterious effect of the variants predicted by bioinformatics tools (Table 1) are still in process. When no new mutation is found, the pipeline offers the possibility of obtaining more variants by mapping against the *CFTR* reference. The next step could then be the search for variants in the 5′ and 3′ UTR regions, which contain regulatory elements,²⁵ among the unreference variants in dbSNP. Indeed, a recent work described a 3′ UTR variant associated with *CFTR*-related disorders.²⁶ A remaining challenge is to define the real impact of variants in noncoding regions. Minigene splicing assay is the classic tool for determining the product generated by splicing variants. When nasal cells are not available, expression minigenes represent a real opportunity to confirm the RNA and protein products generated by splicing variants.¹⁶ Overall, creating a database compiling information obtained from high-throughput sequencing can improve the gap in our ability to interpret the clinical relevance of genomic variations, as has previously been done for well-known mutations.²⁷

Here, functional analysis, minigene splicing assay, and PCR on nasal cells from a CF patient carrying c.1680-883A>G showed that this deep intronic mutation generated a new, high-score 5′ ss (donor site) in intron 12 that is involved in PE inclusion. Among the 1,976 reported *CFTR* mutations, 228 (11.54%) are believed to affect pre-mRNA splicing (<http://www.genet.sickkids.on.ca/>). Most splicing mutations disrupt the canonical ss sequences, completely abolishing exon recognition and/or leading to a nearly complete absence of correctly spliced transcripts. The new c.1680-883A>G mutation strengthens the use of a cryptic donor site. Despite the abundance in the genome of potential PEs (intronic sequences between 50 and 200),^{1,3,28,29} their inclusion does not seem to be a frequent event during normal pre-mRNA processing. The c.1680-883A>G mutation neither creates a splice donor site nor is well conserved, so only functional tests can confirm its deleterious impact. Functional assessment of deep intronic variants may improve our knowledge on the usage of poorly conserved cryptic 5′ or 3′ ss in eukaryote evolution and/or may improve the accuracy of splicing algorithms for these intronic variants. Surprisingly, this mutation is close to another previously identified deep intronic mutation, c.1680-886A>G, which also induces PE inclusion, suggesting that this intronic region may be prone to mutation. The c.1680-886A>G mutation occurs with a frequency of 3.4% in southwestern Europe and with a frequency

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

BONINI *et al* | High-throughput sequencing-based identification of new therapeutic tools in CF

of 0.2% in France.³⁰ Conversely, c.1680-883A>G has never been described before, although here it was identified in three unrelated patients.

The final objective of this work was the design of antisense oligonucleotides for CF treatment. Antisense oligonucleotides for inherited diseases, including Duchenne muscular dystrophy, have been used for several years.³¹ Indeed, PE exclusion by antisense modification of pre-mRNA splicing represents a type of personalized genetic medicine. The development of oligonucleotides that block access to a target site (TSBs) offers new treatment opportunities for other genetic disorders.^{32,33} Here, we used this approach to correct the aberrant splicing caused by deep intronic mutations in the *CFTR* gene (c.1680-883A>G and c.1680-886A>G). The effect of TSBs on aberrant splicing correction in bronchial BEAS-2B cells was rapid and maintained over time, suggesting that TSBs could be a therapeutic tool in patients with CF who have deep intronic mutations in the *CFTR* gene because TSBs restore normal transcripts. These data are particularly interesting for patients with CF because the c.1680-886A>G mutation is the fourth most frequent in southwestern Europe (3.4%), and the threshold of functional mRNA and, subsequently, of *CFTR* protein required for normal functions is very low, having been estimated at 5%.³⁴ It would be interesting to test, if possible, these TSBs in airway cells from patients with CF harboring both mutations tested in this work and to assess TSBs for other intronic splicing mutations in *CFTR*.

To conclude, these data provide proof that small-scale NGS approaches are suitable for the identification of new mutations in noncoding regions and that TSBs can be envisaged for personalized therapies for CF patients.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/gim>

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the French association Vaincre La Mucoviscidose Agence de la Biomedecine, the CHU, and INSERM. We thank Fanny Verneau and Jean-Pierre Altieri (Montpellier, France) for technical assistance.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Faa V, Incani F, Meloni A, et al. Characterization of a disease-associated mutation affecting a putative splicing regulatory element in intron 6b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. *J Biol Chem* 2009;284:30024–30031.
2. Costa C, Pruliere-Escabasse V, de Becdelievre A, et al. A recurrent deep-intronic splicing CF mutation emphasizes the importance of mRNA studies in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2011;10:479–482.
3. Chillón M, Dörk T, Casals T, et al. A novel donor splice site in intron 11 of the *CFTR* gene, created by mutation 1811+1.6kbA→G, produces a new exon: high frequency in Spanish cystic fibrosis chromosomes and association with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 1995;56:623–629.
4. Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, et al. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med* 1994;331:974–980.
5. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009;461:272–276.
6. Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:19096–19101.
7. Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 2011;470:198–203.
8. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010;11:31–46.
9. Trujillano D, Ramos MD, González J, et al. Next generation diagnostics of cystic fibrosis and *CFTR*-related disorders by targeted multiplex high-coverage resequencing of *CFTR*. *J Med Genet* 2013;50:455–462.
10. Abou Tayoun AN, Tunkey CD, Pugh TJ, et al. A comprehensive assay for *CFTR* mutational analysis using next-generation sequencing. *Clin Chem* 2013;59:1481–1488.
11. Raynal C, Baux D, Theze C, et al. A classification model relative to splicing for variants of unknown clinical significance: application to the *CFTR* gene. *Hum Mutat* 2013;34:774–784.
12. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bèroud G, Claustres M, Bèroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e67.
13. Mucaki EJ, Shirley BC, Rogan PK. Prediction of mutant mRNA splice isoforms by information theory-based exon definition. *Hum Mutat* 2013;34:557–565.
14. Houdayer C, Dehainault C, Mattler C, et al. Evaluation of in silico splice tools for decision-making in molecular diagnosis. *Hum Mutat* 2008;29:975–982.
15. Le Guédard-Méreuze S, Vaché C, Baux D, et al. Ex vivo splicing assays of mutations at noncanonical positions of splice sites in *USHER* genes. *Hum Mutat* 2010;31:347–355.
16. Sharma N, Sosnay PR, Ramalho AS, et al. Experimental assessment of splicing variants using expression minigenes and comparison with in silico predictions. *Hum Mutat* 2014;35:1249–1259.
17. Lopez E, Viart V, Guittard C, et al. Variants in *CFTR* untranslated regions are associated with congenital bilateral absence of the vas deferens. *J Med Genet* 2011;48:152–159.
18. René C, Lopez E, Claustres M, Taulan M, Romey-Chatelain MC. NF-E2-related factor 2, a key inducer of antioxidant defenses, negatively regulates the *CFTR* transcription. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:2297–2309.
19. El-Seedy A, Dudognon T, Bilan F, et al. Influence of the duplication of *CFTR* exon 9 and its flanking sequences on diagnosis of cystic fibrosis mutations. *J Mol Diagn* 2009;11:488–493.
20. Brockman W, Alvarez P, Young S, et al. Quality scores and SNP detection in sequencing-by-synthesis systems. *Genome Res* 2008;18:763–770.
21. Wright FA, Strug LJ, Doshi VK, et al. Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nat Genet* 2011;43:539–546.
22. Gu Y, Harley IT, Henderson LB, et al. Identification of *IFRD1* as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease. *Nature* 2009;458:1039–1042.
23. Gallati S. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis. *Appl Clin Genet* 2014;7:133–146.
24. Pagani F, Buratti E, Stuani C, Bendix R, Dörk T, Baralle FE. A new type of mutation causes a splicing defect in *ATM*. *Nat Genet* 2002;30:426–429.
25. Zhang Z, Ott CJ, Lewandowska MA, Leir SH, Harris A. Molecular mechanisms controlling *CFTR* gene expression in the airway. *J Cell Mol Med* 2012;16:1321–1330.
26. Amato F, Seia M, Giordano S, et al. Gene mutation in microRNA target sites of *CFTR* gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis? *PLoS One* 2013;8:e60448.
27. Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, et al. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet* 2013;45:1160–1167.

28. Vaché C, Besnard T, le Berre P, et al. Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: implications for diagnosis and therapy. *Hum Mutat* 2012;33:104–108.
29. Cavaliere S, Pozzi E, Gatti RA, Brusco A. Deep-intronic ATM mutation detected by genomic resequencing and corrected in vitro by antisense morpholino oligonucleotide (AMO). *Eur J Hum Genet* 2013;21:774–778.
30. Federici S, Iron A, Reboul MP, et al. [CFTR gene analysis in 207 patients with cystic fibrosis in southwest France: high frequency of N1303K and 1811+1.6bA>G mutations]. *Arch Pediatr* 2001;8:150–157.
31. Douglas AG, Wood MJ. Splicing therapy for neuromuscular disease. *Mol Cell Neurosci* 2013;56:169–185.
32. Webb TR, Parfitt DA, Gardner JC, et al. Deep intronic mutation in OFD1, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of X-linked retinitis pigmentosa (RP23). *Hum Mol Genet* 2012;21:3647–3654.
33. Nuzzo F, Radu C, Baralle M, et al. Antisense-based RNA therapy of factor V deficiency: in vitro and ex vivo rescue of a F5 deep-intronic splicing mutation. *Blood* 2013;122:3825–3831.
34. Ramalho AS, Beck S, Meyer M, Penque D, Cutting GR, Amaral MD. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:619–627.

Supplement materials and methods

Hybrid capture

Hybrid capture was performed using the NimbleGen SeqCap EZ kit which includes approximately 2.1 million DNA probes varying from 60 bp to 90 bp and covering the 250kb of the *CFTR* locus. Libraries of single stranded DNA fragments were prepared using the GS FLX Titanium Rapid Library Preparation kit. Briefly, genomic DNA samples (total input DNA; 500 ng/each) were individually fragmented by nebulization using compressed nitrogen gas (pressure 2.1 bar) for one minute. Fragments were then end-repaired, ligated to 454 adapters, pre-amplified and hybridized to the NimbleGen SeqCap EZ choice library.

Long-Range PCR Enrichment

Twenty-six overlapping fragments that ranged from 7,300 to 14,500 bp covering the entire *CFTR* gene were PCR amplified from each DNA sample following a long-range protocol and using the SeqTarget Long-Range PCR kit (Qiagen) that facilitates consistent amplification of extra-long templates of up to 40 kbp. Oligonucleotide primers for long-range PCR (LR-PCR) were obtained from a pre-designed from Qiagen or designed using Primer3Plus (sequences available on request) and ordered from MWG. The purified amplicons (SeqTarget Normalization, Qiagen) were quantified using a NanoDrop photometer (ThermoScientific®) and pooled in equimolar amounts. Each sample (750 ng) were individually fragmented by nebulization (as before). After end-repair and phosphorylation by T4 DNA polynucleotide kinase and T4 DNA polymerase, three samples were labelled by ligation with the Multiplex Identifier (MID) oligonucleotide adapters. These unique MID-labelled sequences are located at the 5'-end of each sequence read and provide a "barcode" to identify and assign sequences to the respective samples. Finally, the three libraries were quantified and equal amounts were pooled together.

Sequencing

Adapter-modified fragments were diluted (three samples for the hybrid capture and one sample for the long-range PCR method), annealed to capture beads and clonally amplified by emPCR (Amplification Method Manual – Lib-L; GS Junior Titanium Series, Roche). After emPCR, beads with the cloned amplicons were enriched, loaded onto the 454 picotiter plate and sequenced using the Roche GS Junior Sequencer (454 ROCHE technology) according to the manufacturer's protocol (Sequencing Method Manual, GS Junior Titanium Series, Roche).

Data analysis

Image analysis and base calling of the raw sequencing data were performed using the default "shot-gun" 454 Roche GS Junior data analysis pipeline. The sequence reads were aligned to the reference sequences of human *CFTR* (chr7:117,120,017-117,308,718), chromosome 7 (chr7:1-159,138,663) or the whole human genome (hg 19/build 37). Alignments were carried out with default parameters.

In silico analysis

First, the *CFTR* variants was analysed using Human Splicing Finder 2.4.1 (<http://www.umd.be/HSF/HSF.html>), including two different calculation algorithms (HSF and MaxEnt) and NNSplice (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html; Splice Site Prediction by Neural Network or SSPNN). We assumed that aberrant splicing could occur when a *de novo* splice site (ss) was predicted or when the score of a sub-optimal pre-existing ss was dramatically increased in the mutated sequence. We also evaluated wild type (wt) and mutated sequences using the SpliceAid 2 database (http://193.206.120.249/splicing_tissue.html). To facilitate the comparison between different *in silico* tools, we calculated percent score variation (%) with the following formula $[(WT \text{ score} - Mut \text{ score}) / WT \text{ score}] \times 100$ as previously described (16). The percent score variation is directly calculated on the website for HSF and MaxEnt. We considered the predictions concerning consensus the splice isoforms generated by variants and we used the previously defined increase cutoff values of 10% (HSF and NNSplice) and 15% for the others (11, 14-16). The four programs used are FSplice (<http://linux1.softbery.com/berry.phtml>), Human Splicing Finder (HSF, <http://www.umd.be/HSF/>), and Automated Splice Site and Exon Definition Analysis (ASSEDA, <http://splice.uwo.ca/>) (12, 13).

Second, we evaluated the conservation of the nucleotide position affected by a substitution in a set of selected mammalian orthologues. We first aligned the human genomic sequence of *CFTR* (NC_000007.13) with nine vertebrate orthologues from Ensembl using the MUSCLE3.7 algorithm available at www.phylogeny.fr. Results, shown as percentages of the wt and variant nucleotides, were obtained by analysing the multiple alignments with the Jalview software (<http://www.jalview.org/>). A broader analysis with visualization of the multiple alignments of 19 *CFTR* orthologues, including human *CFTR*, was obtained from UCSC using the Multiz Alignments tool. The wt nucleotide was considered as highly conserved when its frequency was higher than 90%, intermediately conserved between 50 and 90% and poorly conserved when its frequency was lower than 50% and/or when the mutated nucleotide was found with a frequency of at least 10%.

Splicing reporter constructs

The impact of the newly discovered variant on splicing was tested using the pSPL3 exon-trapping vector (kindly provided by Dr I. Bottillo). We amplified the *CFTR* sequence of interest (632 bp) in intron 12 (legacy nomenclature: intron 11) using the patient's genomic DNA (diluted to 5 ng/μl) and the High Fidelity Phusion® polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). The amplicon was inserted in pSPL3 between the *XhoI* and *NheI* restriction sites using the T4 DNA ligase High Concentration (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) according to the manufacturer's instructions. In addition to the wild-type (wt) and mutated (c.1680-883A>G) minigenes, two other *CFTR* minigenes were generated carrying the SNP c.1680-870T>A (negative control for aberrant splicing) or the splicing mutation c.1680-886A>G (1811+1.6kb A>G) (positive control for aberrant splicing). All primer sequences are available upon request. The sequences of the minigene constructs were verified by Sanger sequencing.

Transcript analysis

PCR amplification on RT from the patient's nasal cells and from two non-CF controls were amplified with primers encompassing intron 12 (f11-r13): *CFTR* exon 11 specific forward primer (f11) (GAACTGGAGCCTTCAGAGG) and *CFTR* exon 13 reverse primer (r13) (TCTAGGTATCCAAAAGGAGAGTC). Primers amplifying specifically the pseudoexon, PE (noted f11-rPE) were also used, with exon 11 forward primer (f11) (ACAGAAGCGTCATCAAAGCA) and reverse primer positioned in the pseudoexon (PE) (TTCTCTGTTTATACATGTAATTGTTGG). The program was: 95°C for 5 min, 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, 72°C for 1 min (30 cycles in total) followed by a final elongation step at 72°C for 10 min. In parallel, PCR amplification with beta-actin was produced. Intronic inclusion was also sequenced and confirmed by conventional sequencing.

Supplementary table 1:

Sequencing results with details for each run for the family trio analysis.

<i>Runs</i>	<i>Raw Wells</i>	<i>PF Wells</i>	<i>Dot</i>	<i>Mixed</i>	<i>Med Length</i>	<i>Seq Bases</i>
Capture_P	248414	91739	15134	9613	311	37,1 Mb
Capture_M	289218	220040	6738	7537	497	101 Mb
Capture_F	221971	146529	3005	6267	501	66 Mb
LR-PCR_trio	203604	117097	2612	8076	508	53,5 Mb

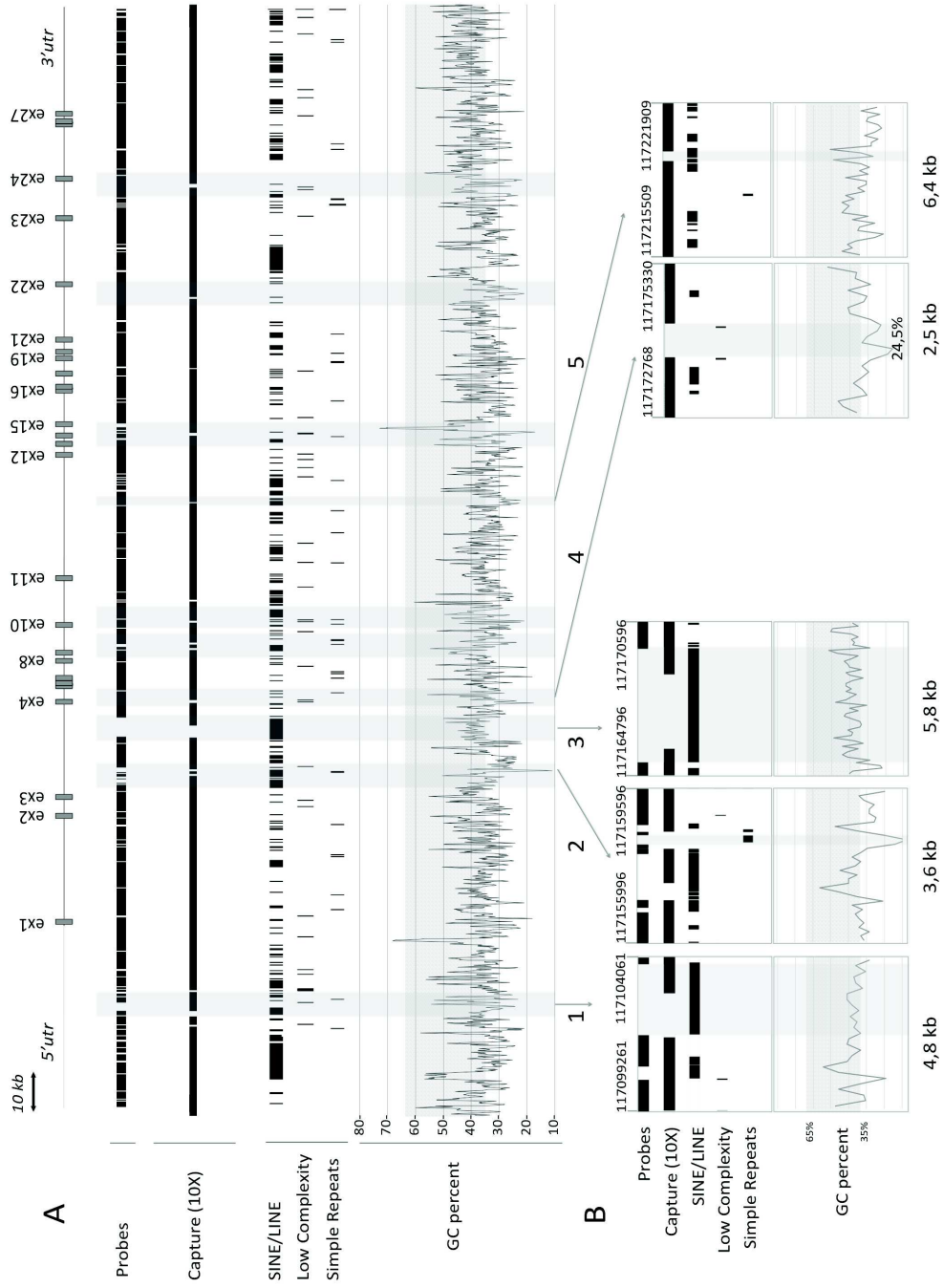
PF Wells: Passed Filter Wells; Med. Length: Median Length; Seq Bases: Sequencing Bases

Supplementary table 2:

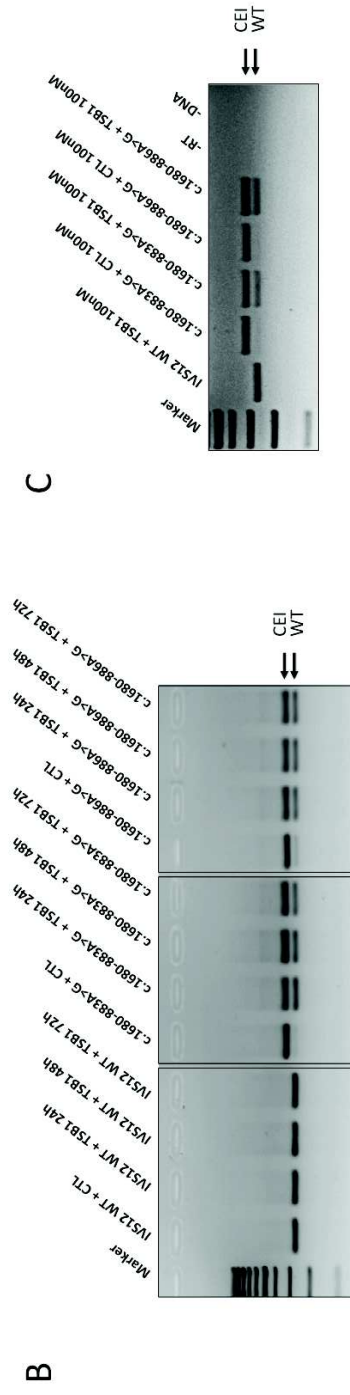
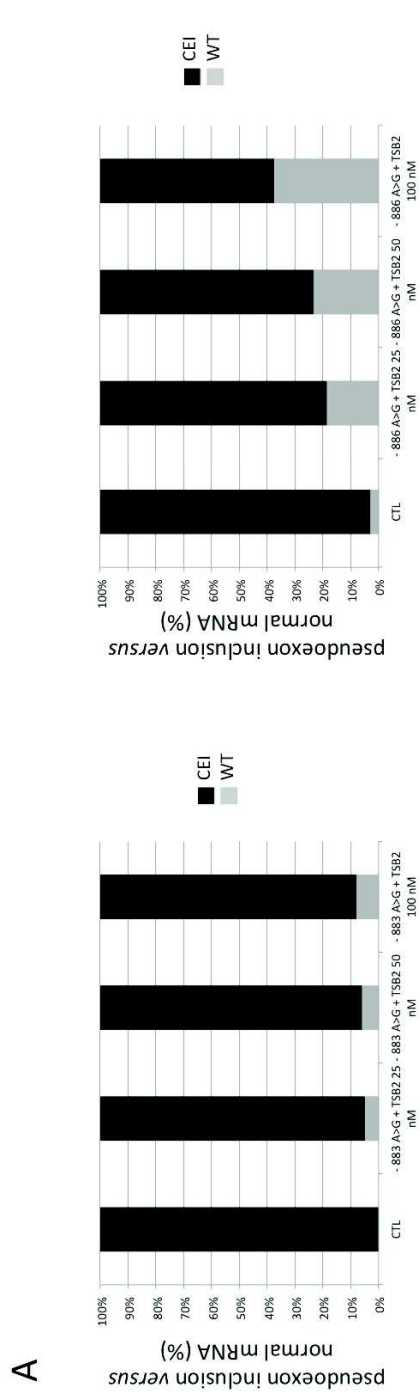
Depth of coverage by region after hybrid capture and LR-PCR enrichment for the family trio analysis.

<i>Runs</i>	<i>Exons</i>	<i>Introns</i>	<i>Other</i>	<i>Total</i>
Capture_P	43,6	54,1	73,9	49,6
Capture_M	94,6	117,6	184	108,7
Capture_F	112,7	108,6	151,9	112,2
LR-PCR_P	91,2	116,6	120,7	104,3
LR-PCR_M	77,2	99,7	120,6	89,4
LR-PCR_F	95,2	97	117,6	96,9

Supplementary figure S1



Supplementary figure S2



C



4.2.3. Discussion

Identification de nouvelles mutations. Les ADN de 18 patients présentant toutes les caractéristiques d'une mucoviscidose classique et sur lesquels une seule mutation sévère a été identifiée, ont été collectés. Le séquençage de ces ADN a été réalisé par un séquenceur 454 Junior (Roche) et deux approches ont été comparées (LR-PCR et capture). Dans un premier temps, seules les mutations impactant l'épissage ont été recherchées. En effet, il existe de nombreux outils bioinformatiques qui permettent d'identifier ce type de mutation. Après l'application d'une "pipeline" d'analyse, 10 variants impactant le processus d'épissage ont été identifiés. Ces variants ont été retrouvés chez 16 individus CF sur 18. Parmi eux, l'effet de la mutation c.1680-883A>G a été validée par des études fonctionnelles, et sur l'ARN du patient. Le caractère pathogène des autres variants est en cours de vérification.

Si le caractère délétère des variants n'est pas confirmé, les régions promotrices, 5'UTR et 3'UTR pourront davantage être étudiées, tout comme pour les deux patients où aucune mutation n'a été retrouvée. Des variants dans ces régions pourraient moduler l'expression du gène *CFTR*. Par exemple, une mutation au niveau du promoteur peut empêcher la fixation de facteurs de transcription activateurs ou favoriser le recrutement de facteurs répresseurs, diminuant ainsi la transcription voir même l'abolir. Il a été montré par des expériences de vecteurs rapporteurs et d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), que dans les cellules des canaux déférents, le variant du promoteur c.-33G>A favorise le recrutement du facteur répresseur FOXI1, diminuant ainsi la transcription (Lopez *et al.* 2011). A l'inverse, le variant c.-94G>T diminue l'affinité des facteurs activateurs Sp1 et USF2 dans des cultures bronchiques Beas-2B (Taulan *et al.* 2007). Une substitution peut également créer un codon d'initiation prématuré et ainsi créer l'utilisation d'un cadre de lecture ouvert (uORF), en amont de celui qui est normalement utilisé. Ce dernier peut ainsi inhiber la traduction de l'ARNm en empêchant le ribosome d'atteindre le codon d'initiation utilisé en condition physiologique. C'est le cas du variant c.-34C>T qui crée un uORF chevauchant l'ORF principal, inhibant ainsi l'expression du gène de 85 à 99% (Lukowski *et al.* 2011). Les régions 3'UTR sont également importantes puisque des substitutions dans ces régions peuvent modifier l'affinité de protéines impliquées dans la stabilisation du transcrit (ARE-BP) ou encore des miARNs. La présence d'un variant c.*1043A>C induit l'augmentation de la fixation de miR-509-3p dans la région 3'UTR *CFTR*, pouvant expliquer une diminution du

taux de transcrits *CFTR* (Amato *et al.* 2013). Ces données soulignent l'importance de ces régions non traduites.

Enfin, au niveau des introns se trouvent des zones transcriptionnellement actives : les sites DHS (Smith *et al.* 2000; Rowntree *et al.* 2001; Paul *et al.* 2007; Ott *et al.* 2009b). Ces régions présentent une tissu-spécificité et leur mécanisme de régulation n'est pas bien défini. Il est possible que des variations dans le tissu pulmonaire, au niveau de ces sites puissent influencer l'expression du gène *CFTR*.

Identification de polymorphismes. En plus de la détection de mutations dans les régions non codantes, ce travail a permis de collecter des informations précieuses sur les polymorphismes présents sur l'ensemble du locus *CFTR*. Ainsi ces données fournissent un catalogue de variants identifiés par le séquençage NGS qui ne sont pas forcément répertoriés sur la base de données internationale dbSNP. La création d'un " catalogue de variants " dédié au locus *CFTR* devrait faciliter les analyses bioinformatiques post-séquençage, par une exclusion de variants classiquement retrouvés chez des individus non-CF, des apparentés ou des patients CF chez qui les deux mutations ont été détectées. Les données du laboratoire issues du séquençage de 100 ADN ont permis d'identifier actuellement 132 variants répartis sur les 250 kb du locus *CFTR* dont 120 situés dans les introns. La répartition de ces derniers est homogène selon la taille des introns (en moyenne 0,65 variant pour 1 000 pb) (**voir figure 1**).

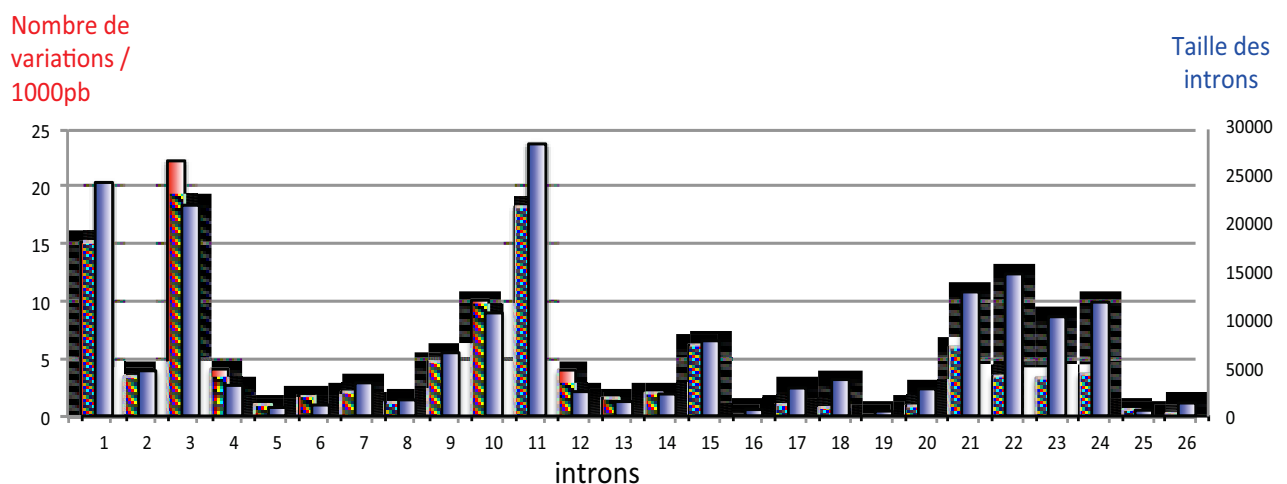


Figure 1 : Distribution des variants selon la taille des introns. Données du laboratoire obtenues par NGS.

Ce " catalogue de variants " pourra également servir pour la recherche de mutations chez les patients CFTR-RD incluant les ABCD. Pour ces ADNs, la difficulté est l'identification de mutations modérées. Ce catalogue pourrait également renseigner sur la présence d'allèles complexes. La détermination de certains haplotypes qui ségrégeraient ensemble pourrait présenter un réel intérêt pour redéfinir des corrélations génotype-phénotype.

Comparaison des deux approches. La LR-PCR est une technique plus fastidieuse à mettre au point que la capture, cependant elle permet d'obtenir une meilleure couverture que cette dernière. Un des problèmes majeurs avec le système de capture, est que les sondes peuvent s'hybrider à différents endroits sur le génome autre que sur le locus d'intérêt. Dans l'étude présentée, on observe que la capture entraîne un nombre de lectures très élevé pour l'exon 10, un exon retrouvé dupliqué dans le génome (Rozmahel *et al.* 1997, El-Seedy *et al.* 2009). Ainsi, la LR-PCR permet d'éviter qu'un variant retrouvé dans d'autres régions chromosomiques soit identifié comme un variant du gène *CFTR*.

Utilisation d'oligonucléotides antisens pour corriger le transcrit c.1680-883A>G. Le variant c.1680-883A>G situé dans l'intron 12, seulement 3 pb de base en amont d'une mutation déjà identifiée (c.1680-886A>G), renforce un site donneur et entraîne l'insertion d'un exon cryptique de 53 pb (voir figure 2).

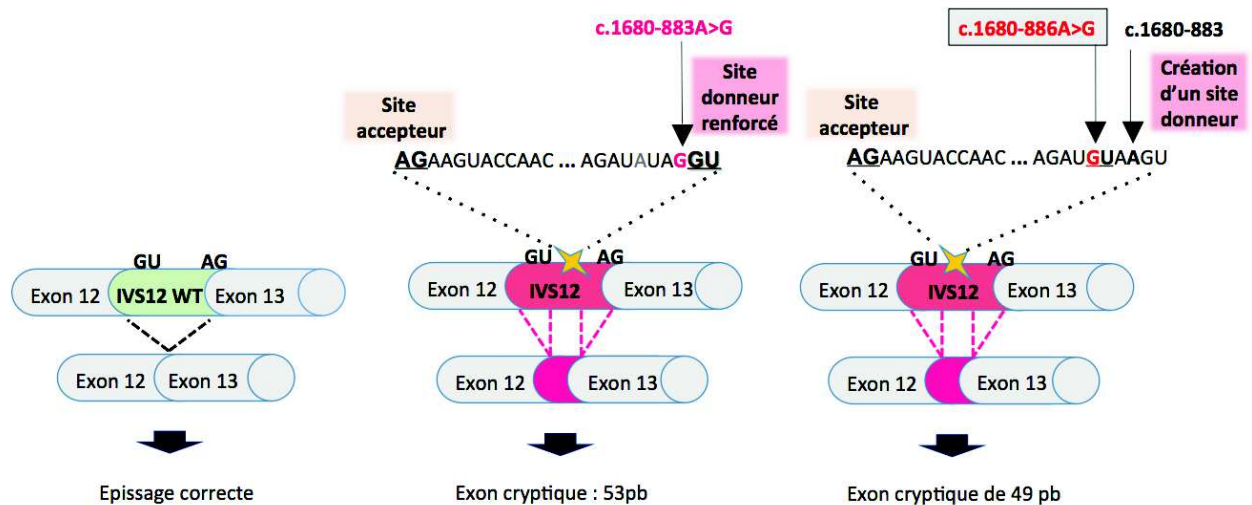


Figure 2 : Impact des variants c.1680-883A>G et c.1680-886A>G sur l'épissage.

Afin de restaurer un transcrit sauvage correctement épissé, des oligonucléotides antisens nommés TSB (*pour Target Site Blocker*) ont été testés. L'utilisation d'un TSB, masquant le nouveau site accepteur reconnu par le splicéosome restaure, en présence des mutations c.1680-883A>G ou c.1680-886A>G, un épissage normal dans la lignée cellulaire Beas-2B. Ces résultats ont également été observés dans des cultures primaires issues de cellules nasales. En particulier, les résultats de cotransfection (minigène + TSB1) réalisés dans la lignée bronchique Beas-2B montrent que :

- TSB1 est efficace à faible concentration (traitement de 24h, molécule à 50nM) : plus de 50% de transcrits restaurés.
- Un traitement prolongé de TSB1 à 50nM (24h, 48h et 72h) ne restaure pas totalement l'épissage.
- L'effet de TSB1 est maintenu dans le temps. Lorsque les cellules sont traitées 16h avec TSB1, les effets de ce dernier restent visibles 24h, 48h et 72h post traitement.

Les minigènes permettent de confirmer l'impact d'une mutation lorsque les cellules du patient ne sont pas disponibles, toutefois ces vecteurs ne tiennent pas compte de l'influence des séquences environnantes (exons et introns), ni des conditions de stress cellulaires en contexte pathologique. En effet, une étude réalisée dans des myotubes a montré que le TNF- α pouvait diminuer l'expression des facteurs d'épissage ASF/SF2 (protéine SR) (Xiong *et al.* 2006). Il serait ainsi intéressant d'évaluer l'impact des facteurs environnementaux sur l'inclusion des pseudoexons dans des cultures ALI. Par exemple, les cellules pourraient être exposées à un stress (traitement au GSNO, papanoate) ou encore à des traitements par cytokines (IL-8, TNF- α). D'autre part, une des perspectives de ce travail est d'évaluer l'impact protéique de la mutation c.1680-883A>G identifiée. Pour cela, l'intron 12 sauvage ou muté pourrait être cloné dans un vecteur contenant l'ADNc du gène *CFTR*. Ainsi l'impact sur la protéine pourrait être évalué par Western blot et immunofluorescence, et l'activité du canal pourrait être testée. La restauration par TSB1 pourra ainsi être également évaluée au niveau protéique.

Combinaison des thérapeutiques. Dans des cultures primaires nasales issues d'individus porteurs des mutations c.1680-883A>G ou c.1680-886A>G, il serait pertinent d'évaluer la combinaison de TSB1 avec des molécules inhibant le NMD tels que des siARNs

dirigés contre les ARNm codant des protéines essentielles au mécanisme de surveillance des ARNs (UPF1, UPF2) (Garneau *et al.* 2007); ou des molécules inhibant la synthèse protéique telle que la cycloheximide (Linde *et al.* 2007). Une combinaison de TSB1 avec des molécules permettant une translecture des codons stop comme la gentamycine (Wilschanski *et al.* 2003) ou encore le PTC-124 (Sermet-Gaudelus *et al.* 2010) pourrait également être envisagée.

L'avantage de l'utilisation des TSBs est leur spécificité. Ainci, ces molécules ouvrent de nouvelles perspectives pour une thérapeutique adaptée au génotype du patient.

4.2.4. Autres résultats non publiés

Récemment, des cellules nasales d'individus porteurs de la mutation c.1680-886A>G à l'état hétérozygote ont été obtenues. Après l'obtention d'un épithélium pseudostratifié en ALI, l'impact de la molécule TSB1 sur les transcrits *CFTR* endogène a été évalué. Les résultats indiquent qu'un traitement avec la molécule TSB1 (100nM, 24h), par l'utilisation d'agents de transfection, permet une diminution de 25% de la population d'ARNm muté contenant l'exon cryptique (**figure 3**).

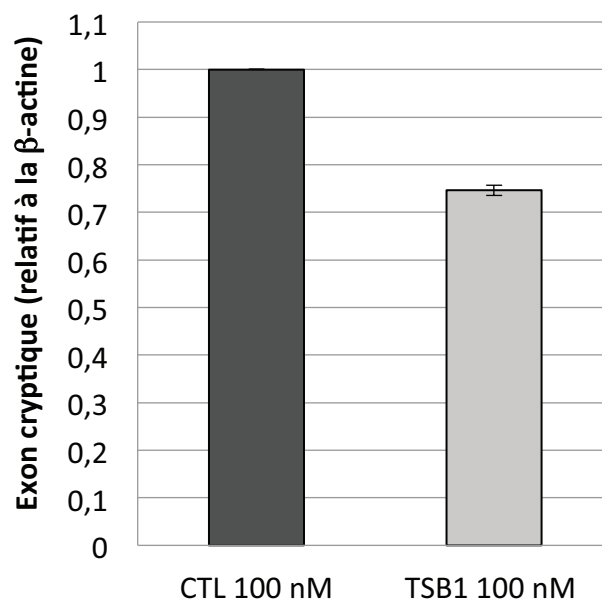


Figure 3 : Résultats de RT-qPCR indiquant le taux de transcrits *CFTR* porteurs de l'exon cryptique, dans un épithélium ALI issu d'un individu porteur de la mutation c.1680-886A>G, à l'état hétérozygote.

L'étude d'un autre variant c.3874-4522A>G, identifié lors du séquençage NGS et présenté dans l'article, a également été initiée. Comme précédemment décrit, des outils de prédiction bioinformatiques ont été utilisés pour définir l'impact de ce variant.

A

aaactgctttattgTTTTTgTTTgacatcc**AG**tgctaaagcataatgctggttgagtgaaatatacatgagca
 accctgagaactcaatatagcctcacgtggtgccactgagttgagttgaggagtcaagctgtagcaaaaag**GT**tt
 gtcaccgg**GT**gagtaatggtgctcttatttttctctgggtctcaagaagtgctctttatgacatatatggcatta

B

Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
Acceptor	tttgacatccaatg	tttgacatccagTG	57.04	85.99	NA	New site +50.75

C

Score	Exon	Intron
0.88	caaaaag	g ttgtca
0.99	tcaccgg	g tgagtaa

Figure 4 : Impact de la variation c.3874-4522A>G.

(A) Séquence IVS23. Le variant est annoté en rouge. (B) Résultats de l'analyse *in silico* Human Splicing Finder/ HSF Matrices. (C) Résultats de d'analyses *in silico* Nsplice.

Les outils bioinformatiques indiquent que le variant c.3874-4522A>G entraîne la création d'un nouveau site accepteur (**figure 4-B**). Ils indiquent également la présence de deux sites donneurs forts (score 0.88 et 0.99) après ce nouveau site accepteur créée (**figure 4-C**). Ces deux sites donneurs sont surlignés en jaune dans la séquence IVS23 (**figure 4-A**).

Pour tester fonctionnellement l'impact de ce variant, une séquence de l'intron 23 sauvage (WT) ou porteur du variant c.3874-4522A>G a été clonée dans un système de minigène et transfectée dans des cellules bronchiques Beas-2B, comme précédemment décrit.

L'utilisation des amorces SD6-F et SA2-R, situées de part et d'autre de la séquence intronique intégrée dans le vecteur, amplifie à partir des ADNc issues des cellules transfectées, un fragment de 263 pb (séquence sauvage) ou un fragment de 392 pb (séquence mutée) (**figure 5**). Ainsi, les résultats indiquent que la présence du variant c.3874-4522A>G entraîne l'insertion d'un exon cryptique (voir le fragment amplifié représenté avec une étoile rouge sur le gel) contrairement à la séquence sauvage (WT). La présence de cet exon cryptique sur l'ARN du patient devra être confirmée.

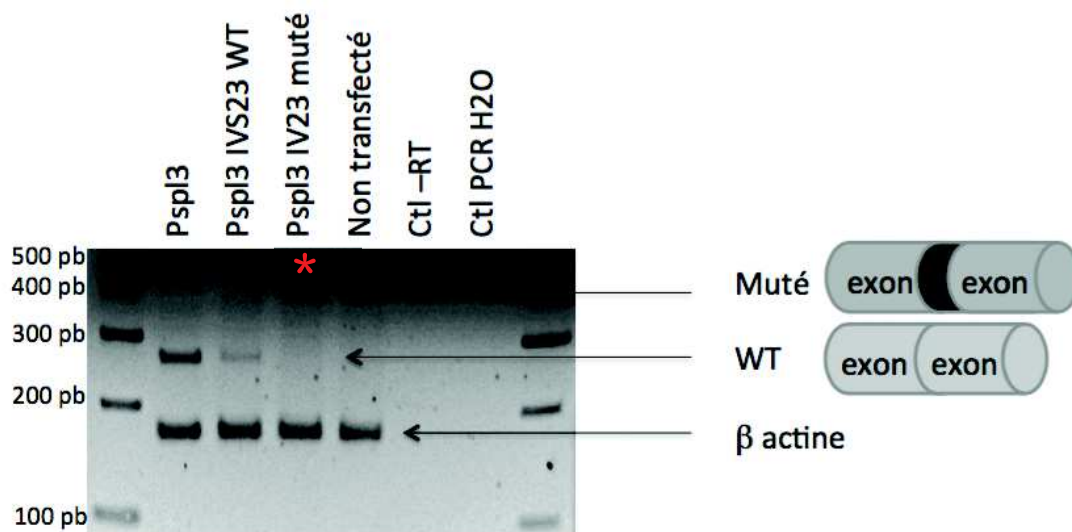


Figure 5 : Résultats des RT-PCR obtenus après transfection de minigènes.

L'impact sur l'épissage, des autres variants identifiés dans cette étude est en cours. L'utilisation d'oligonucléotides de type TSBs est envisagée pour chaque mutation, lorsque celles-ci seront confirmées par l'étude fonctionnelle (système de minigène) et vérifiées sur l'ARN de patient.

4.3. Dérégulation des miARNs dans les modèles ALI CF et non-CF

4.3.1. Introduction

Le gène *CFTR* présente un profil d'expression spatio-temporel très finement régulé. Son transcrite est soumis à une régulation post-transcriptionnelle par sa région 3'UTR qui contient des motifs ARE (AU rich elements) ainsi que des motifs de fixation pour des miARNs (Baudouin-Legros *et al.* 2005; Hassan *et al.* 2012; Amato *et al.* 2013; Megiorni *et al.* 2013). Bien qu'aucune ARE-BP (AU-rich binding protein) n'est été impliquée à ce jour dans la régulation du gène *CFTR*, l'action directe de différents miARNs (miR-494, miR-509-3p, miR-1246) sur le transcrite *CFTR* a été décrite (Gillen *et al.* 2011; Ramachandran *et al.* 2013; Oglesby *et al.* 2013). De plus, les ARE-BP et les miARNs peuvent agir de manière coopérative (Jing *et al.* 2005; Kim H.H. *et al.* 2009; Sun *et al.* 2010) ou compétitive (Bhattacharyya *et al.* 2006), suggérant ainsi qu'il est nécessaire de considérer leur implication de manière combinée (Jacobsen *et al.* 2010). Nous avons ainsi montré une coopération entre miR-101 et la ARE 6074 sur l'extrémité 3'UTR du gène *CFTR* (voir article "*Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis*").

Au delà de leur action directe au niveau de la partie 3'UTR, une dérégulation de certains miARNs a été observée dans des modèles cellulaires CF comparé à des modèles non-CF (**figure 1**). Ces miARNs peuvent participer à l'expression du gène *CFTR* (Ramachandran *et al.* 2012; Oglesby *et al.* 2013), à l'inflammation (Bhattacharyya *et al.* 2011; Oglesby *et al.* 2010; Oglesby *et al.* 2015a) ou encore réguler des gènes impliqués lors d'un stress du réticulum (Oglesby *et al.* 2015b). De plus, d'autres miARNs sont décrits pour être induits dans des cultures CF au cours d'une infection (Weldon *et al.* 2014). Dans la littérature, le profil global de la dérégulation des miARNs a été évalué dans des lignées IB3-1 CF versus IB3/S9 (Bhattacharyya *et al.* 2011), des brossages bronchiques CF versus non-CF (Oglesby *et al.* 2010) et des cultures en interface air liquide issues des voies respiratoires (trachées et bronches) (Ramachandran *et al.* 2013) comme illustré dans la **figure 1**.

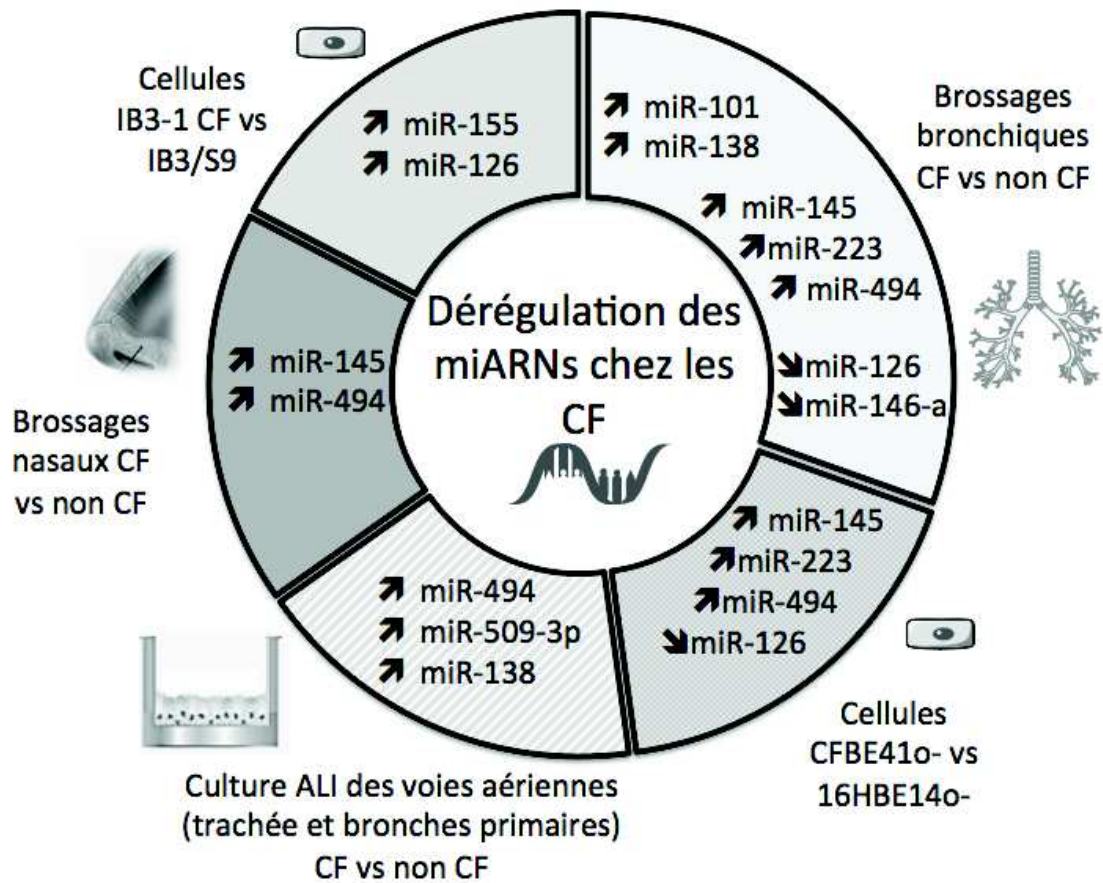


Figure 1 : Dérégulation des miARNs décrite dans la littérature entre les modèles CF et non-CF

Les auteurs de ces études ont utilisé une approche de PCR quantitative afin de mesurer le taux endogène des différents miARNs. Cependant, les systèmes impliquant des cartes microfluidiques de type TLDA (*TaqMan Low Density Arrays*) utilisés dans ces travaux, sont basés sur une pré-amplification préalable à l'aide d'amorces spécifiques de certains miARNs (moins de 700 miARNs ciblés). Cette approche ciblée (TLDA) ne permet donc pas d'analyser tous les miARNs matures décrits sur la base de données miRBase, d'autant plus que le taux des miARNs peut varier en fonction des tissus et de la condition étudiée. Seules des techniques de séquençage de seconde génération permettent d'analyser, sans à priori, le profil complet de l'expression des miARNs. Ainsi, l'étude du taux de l'ensemble des miARNs (miRNome) a été envisagée par cette approche, sur des cultures d'épithéliums respiratoires cultivées en interface air-liquide (ALI).

Ces cultures ALI sont des modèles qui permettent d'obtenir un système pseudo-stratifié et donc de « mimer » au mieux les conditions physiologiques *in vivo*. En effet, ces cultures permettent d'obtenir des épithéliums composés de cellules cylindriques ciliées où la barrière épithéliale est reconstituée. De plus, ces modèles permettent d'évaluer l'internalisation et l'action de molécules thérapeutiques. Toutefois, l'obtention des cultures primaires bronchiques est rare et la mise en culture est délicate. Les cultures issues de polypes ou de cellules nasales sont des modèles alternatifs. Cependant, une question reste en suspens : présentent-elles le même profil d'expression des miARNs que le modèle bronchique ainsi que les mêmes dérégulations entre CF et non-CF ? De plus, il est décrits que les épithéliums CF sont morphologiquement différents (Adam *et al.* 2014). Comparer ces modèles pourrait peut-être permettre d'identifier des miARNs caractéristiques d'un épithélium du tractus respiratoire CF.

L'objectif de ce travail consiste donc à étudier le profil d'expression des miARNs dans trois modèles d'épithélium respiratoires, entre des cellules issues d'individus CF (homozygotes p.Phe508del) et non-CF, par des approches de séquençage de seconde génération.

4.3.2. Matériel et méthodes

4.3.2.1. **Etudes fonctionnelles**

Cultures cellulaires

Les cellules Beas-2B ont été utilisées et cultivées comme précédemment décrit (voir article "*Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis*"). La mise en place des cultures ALI (28 jours de différenciation) issues de curetage de cellules nasales est également détaillée dans ces travaux publiés.

Transfections cellulaires, expériences de vecteurs rapporteurs, quantification des miARNs et des ARNm par RT-qPCR

Les protocoles utilisés ont précédemment été décrits dans l'article "*Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis*". Seul l'agent de transfection utilisé a été modifié (Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen).

4.3.2.2. **Etude du profil d'expression des miARNs**

Extraction ARN

Les ARNs totaux des échantillons ont été extraits au Trizol (Invitrogen). La quantification a été réalisée à l'aide d'un nanodrop et validée par un système bioanalyser (Agilent 2100).

Profil d'expression par TLDA

Le profil des miARNs a été analysé par cartes microfluidiques (TaqMan® Human MicroRNA Array Set v2.0, Applied Biosystems) qui permet l'analyse de 667 miARNs différents. Après une extraction ARN et une étape de reverse transcription spécifique à partir d'1 µg d'ARNs totaux (Megaplex™ RT primers, Human Pool Set v2.0, Applied Biosystems), les échantillons ont été quantifiés par PCR en temps réel (Applied Biosystems 7900 HT Real-Time PCR system). Les données ont été analysées par le logiciel RG Manager (Applied Biosystems). Pour chaque échantillon, le facteur de normalisation a été calculé en fonction

des gènes contrôles RNU44 et RNU48. Le ΔCq a ensuite été calculé pour chaque miARN (Cq(miRNA)-normalization factor).

Profil d'expression par séquençage

1 ug d'ARN total (RIN>7) de chaque échantillon a été utilisé pour réaliser une librairie selon le protocole TruSeq Small RNA kit (Illumina®, San Diego, USA). Brièvement, après la ligation d'adaptateurs aux extrémités 5' et 3', les ARNs ont été rétrotranscrits avec la Superscript II (Life Technologies, Rockville, USA) puis les ADNc ont été amplifiés avec des primers contenant des barcodes (nécessaires pour différencier les échantillons). La qualité des ADNc a été contrôlée par Bioanalyser (High Sensitivity Chip, Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Pour finir, 12 librairies ont été mélangées pour être séquencées (MiSeqDx, Illumina®).

4.3.3. Résultats

Quantification du taux de miARNs dans les cultures nasales en ALI par TLDA

Afin de comparer les deux approches d'étude d'un miRNome, une quantification ciblée des miARNs a été réalisée par un système TLDA, sur des épithéliums ALI CF issus de cellules nasales. Ces épithéliums ont été cultivés pendant 28 jours en interface air liquide afin d'obtenir un épithélium différencié. Dans un premier temps, afin d'évaluer l'état de l'épithélium, des extractions ARN à différents temps (J3, J7, J14 et J21) ont été réalisées. Les résultats indiquent que dès le 21^{ème} jour, les cellules nasales expriment les transcrits *FOXA2*, *SOX17* et *FOXJ1*, des marqueurs qui reflètent une différenciation cellulaire (**figure 2**).

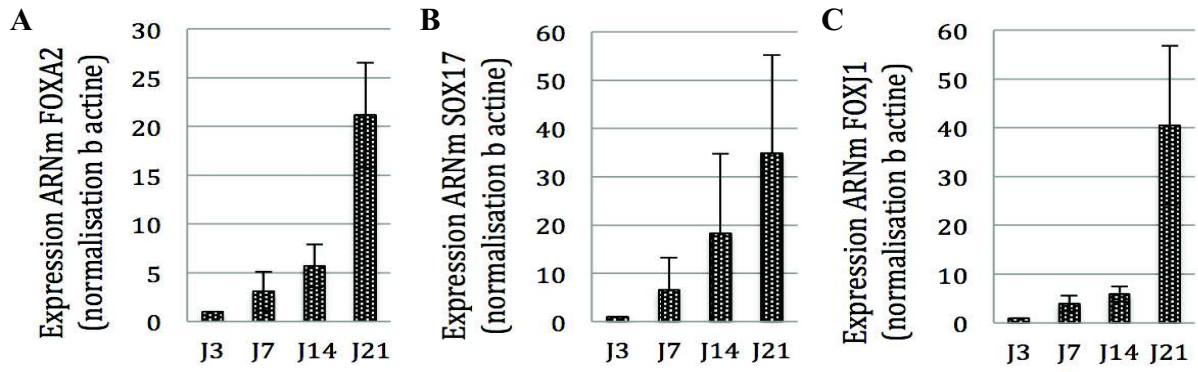


Figure 2 : Quantification du taux d'ARNm *FOXA2* (A), *SOX17* (B) et *FOXJ1* (C) au cours de la différenciation cellulaire par RT-qPCR (cultures ALI, cellules nasales).

Les ARNs totaux issus de 5 individus CF et 5 individus non-CF ont ensuite été rétrotranscrits à l'aide d'amorces spécifiques (protocole Applied Biosystems), puis quantifiés par TLDA. Les résultats indiquent une surexpression des miARNs 27b-3p, 27b-5p, 100-3p (100*), 942-5p et 146a-5p dans les échantillons issus de patients homozygotes p.Phe208del (**figure 3**).

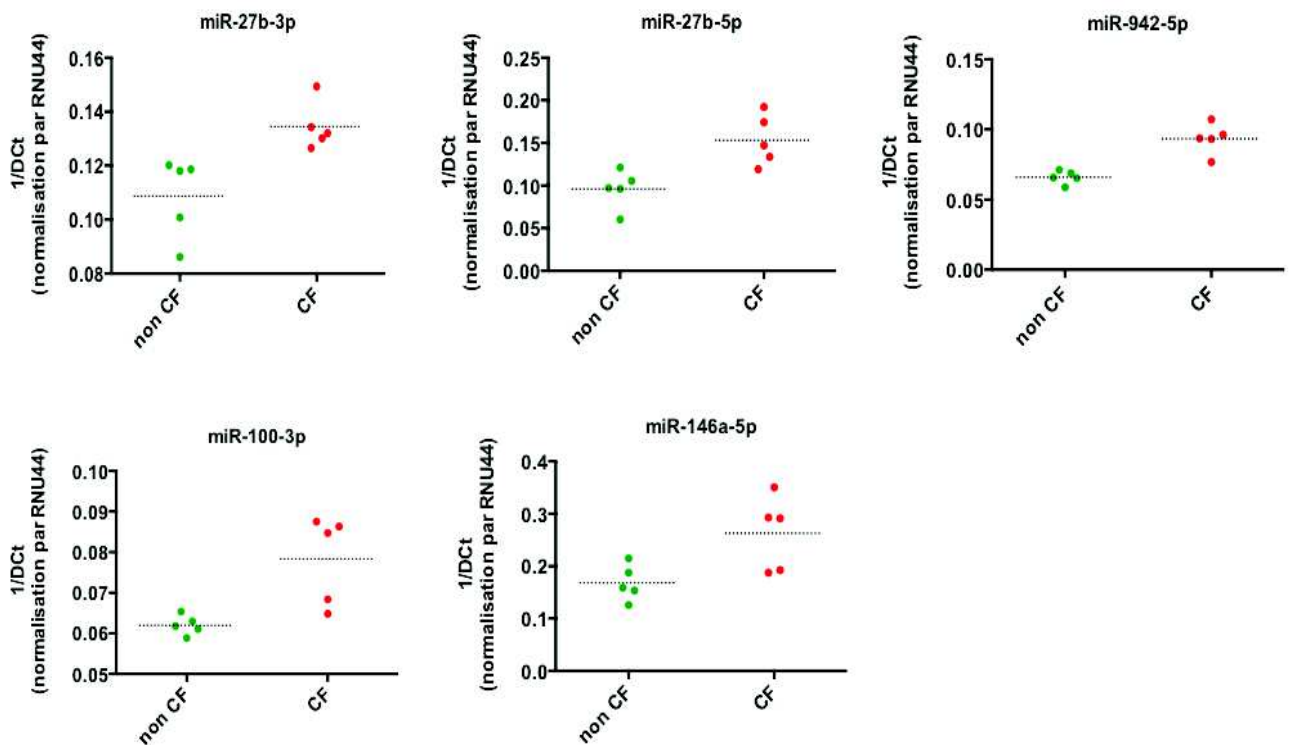


Figure 3 : miARNs retrouvés dérégulés dans les cultures ALI issues de cellules nasales CF et non-CF, par quantification sur carte microfluidique (TLDA).

MiR-146a est lié à la réponse inflammatoire et dérégulé dans la BPCO (broncho-pneumopathie chronique obstructive) et l'asthme (Brown *et al.* 2014). MiR-27b est décrit comme acteur dans la réponse lors d'un stress oxydatif (Thulasingham *et al.* 2011) et dans la croissance et l'invasion des cellules cancéreuses pulmonaires (Wan *et al.* 2014). MiR-942 ciblerait de nombreux gènes impliqués dans la voie calcique (**figure 4**).

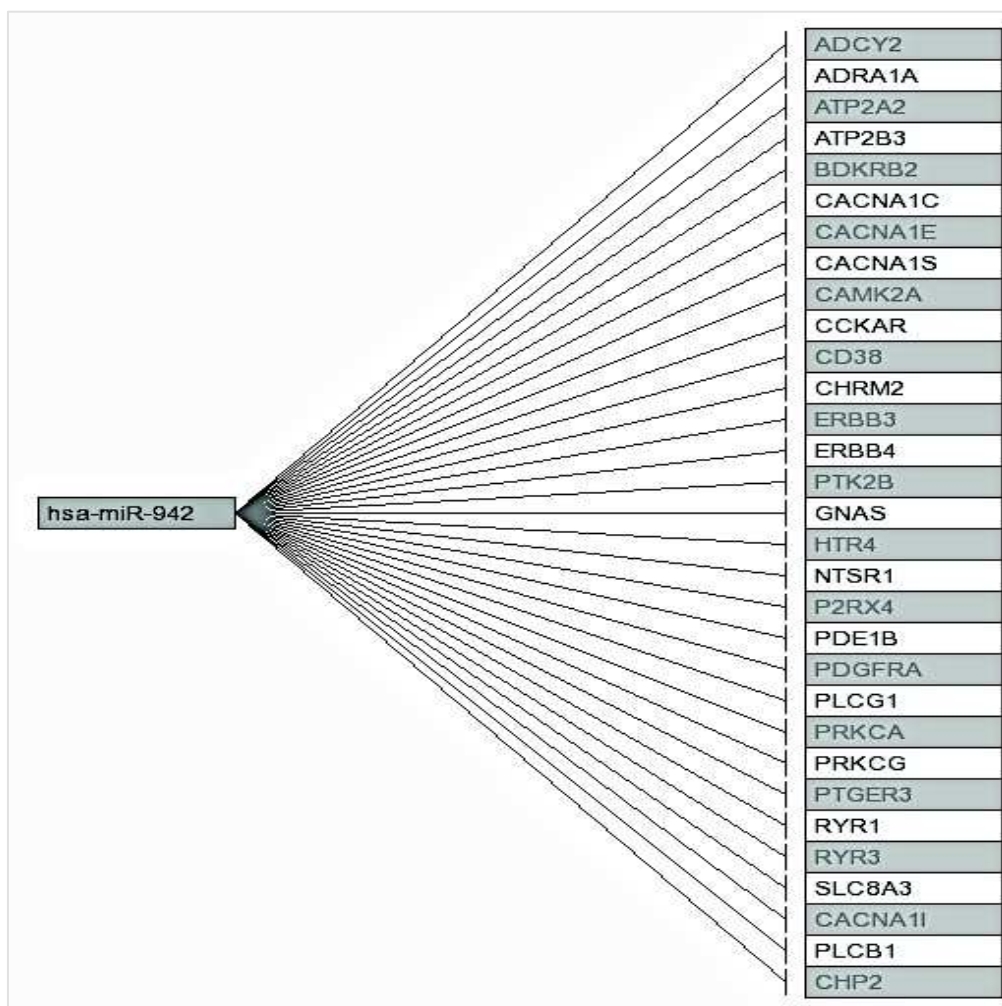


Figure 4 : miR-942 ciblerait la région 3'UTR de 31 transcrits impliqués dans la voie calcique (logiciel miRTar).

De plus, selon les sites de prédictions bioinformatiques, miR-942 et miR-100* pourraient se fixer sur la région 3'UTR du gène *CFTR* (TargetScan et ma22v1.0).

Utilisation d'inhibiteurs dirigés contre les miARNs retrouvés dérégulés dans le TLDA

L'expression des miARNs retrouvés dérégulés par TLDA dans les échantillons CF, a été vérifiée dans le modèle bronchique Beas-2B afin d'évaluer leur impact (direct ou indirect) sur la région 3'UTR *CFTR*. Pour cela, des inhibiteurs dirigés contre miR-27b, miR-27b*, miR-100*, miR-146a et miR-942 (Power Inhibitor, Exiqon, 100 nM) ont été testés sur une construction contenant un gène rapporteur luciférase sous le contrôle de la région 3'UTR *CFTR*. Les résultats indiquent que dans la lignée Beas-2B, parmi les inhibiteurs testés, celui dirigé contre miR-100* augmente plus de 6 fois l'activité luciférase (**figure 5**). Ces données, également obtenues la lignée IB3, suggèrent que miR-100* pourrait avoir une action sur le transcrit *CFTR*.

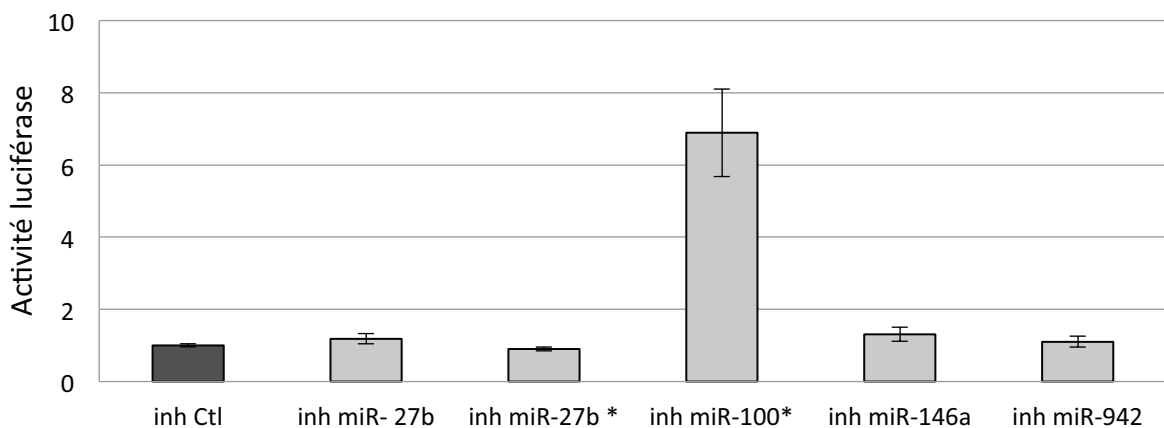


Figure 5 : Effet des inhibiteurs de miARNs sur la région 3'UTR *CFTR* dans la lignée Beas-2B (n = 21). Résultats similaires obtenus dans la lignée IB3.

Evaluation de l'action de miR-100 sur la région 3'UTR *CFTR*.*

Tout comme dans les cellules nasales CF, le taux de miR-100* est faible dans les cellules bronchiques Beas-2B (34 Ct en moyenne) (**figure 6**). Cependant, malgré la faible expression de ce miARN, l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre miR-100* stabilise la région 3'UTR *CFTR* (**figure 5**). Afin de confirmer l'action de ce miARN, l'effet d'un précurseur a donc été testé (Pre-miR miRNA precursor, Ambion, 20 nM).

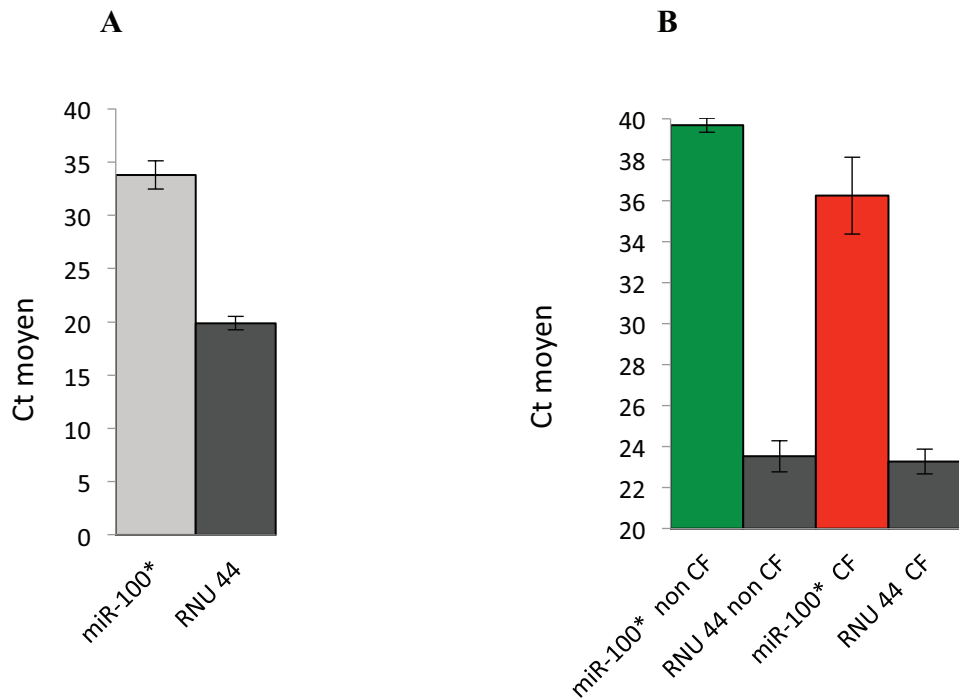
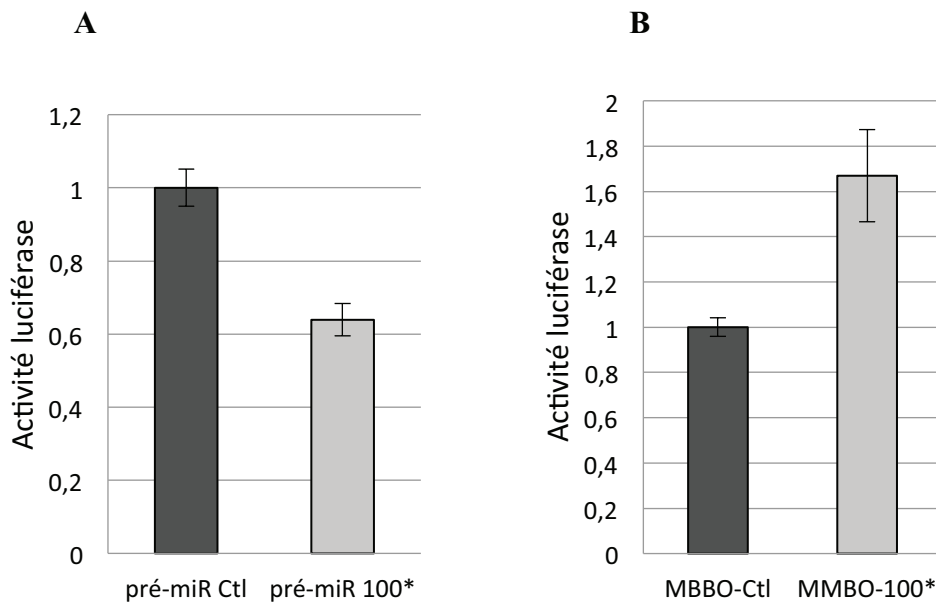


Figure 6 : Taux de miR-100* dans la lignée Beas-2B (A) et les cultures ALI nasales (B). L'expression est représentée en Ct.

Comme illustré dans la **figure 7A**, les résultats montrent que le pré-miR-100* induit une diminution de l'activité luciférase, confirmant ainsi l'action de l'ARN non codant sur la région 3'UTR *CFTR*.

Afin d'évaluer la fixation directe de miR-100*, le "design" d'un oligonucléotide bloqueur (avec des modifications LNA) dirigé contre le motif de fixation de ce miARN (MBBO-100*), a ensuite été réalisé (société Exiqon, molécule utilisée à 100nM). La molécule MBBO-100* augmente légèrement l'activité luciférase (**figure 7B**). L'utilisation combinée du pré-miR-100* et du MBBO-100* est en cours. Des expériences de dégénérescence du motif de fixation de miR-100* permettraient également d'infirmer ou de confirmer si l'action est directe ou indirecte.



Figures 7 : Rôle de miR-100* sur la région 3'UTR *CFTR* dans la lignée Beas-2B. A- Effet du précurseur mimant l'effet de miR-100* (n=27). B- Effet d'un oligonucléotide antisens masquant le site de fixation de miR-100* (n=18) sur la région 3'UTR *CFTR*.

Etant donné que l'action directe ou indirecte de miR-100* n'est pas clairement élucidée, d'autres cibles que le transcrit *CFTR* ont été recherchées. Les logiciels bioinformatiques indiquent que miR-100* aurait comme cibles potentielles des ARNm codant des ARE-BP telles que les protéines HNRNPD (prédictions miRNA.org) et ELAVL1 (prédictions miRTar). La présence de 7 motifs AU-rich sur la région 3'UTR *CFTR* a été précédemment décrite (voir article "*Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis*"), cependant les ARE-BP qui s'y fixent ne sont pas encore définies. Afin de savoir si miR-100* peut réguler le transcrit *CFTR* de manière indirecte, l'impact de ce miARN sur les transcrits des ARE-BP a été évalué. Les cellules Beas-2B ont été transfectées avec le pré-miR-100* (20nM) durant 24h. Après vérification de la surexpression de ce miARN par RT-qPCR, le taux endogène d'ARNm *HNRNPD* et *ELAVL1* a été quantifié. Comme l'indique la **figure 8**, aucune modification significative du taux de ces deux transcrits n'est observée après transfection.

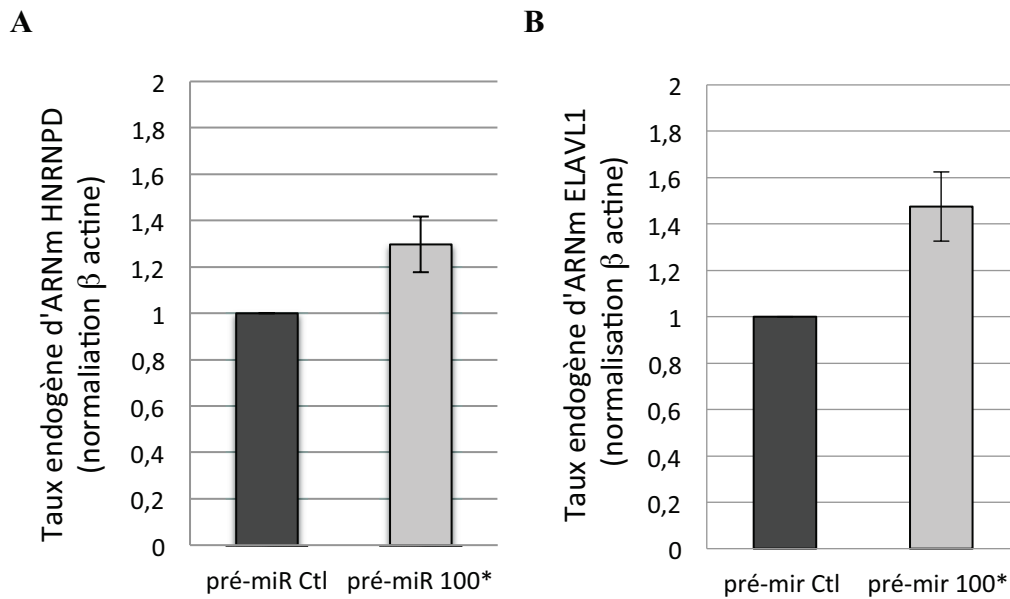


Figure 8 : Effet du pré-miR-100* sur le taux endogène des ARNm *HNRNPD* (A) et *ELAVL1* (B) dans les cellules Beas-2B.

Parallèlement, le rôle des protéines HNRNPD et ELAVL1 a été évalué par des expériences de co-transfection, avec des siARNs dirigés contre les transcrits codant ces ARE-BP (Dharmacon, SMARTpool ON-TARGETplus siRNA, 50nM) et un gène rapporteur sous contrôle de la région 3'UTR *CFTR* (**figure 9**). Un siARN dirigé contre le transcrit *KHSRP*, une cible de miR-27-3p (prédictions targetScan, piTarSites, RNA22 et miRanda), a également été testé. Les résultats montrent que l'utilisation de siARNs dirigés contre ces transcrits n'influence pas l'activité luciférase. Ces expériences semblent indiquer que les protéines HNRNPD, ELAVL1 et KHSRP ne participent pas à la stabilisation du transcrit *CFTR*.

D'autres études sont nécessaires pour définir si miR-100* pourrait agir sur d'autres ARE-BP ou d'autres facteurs.

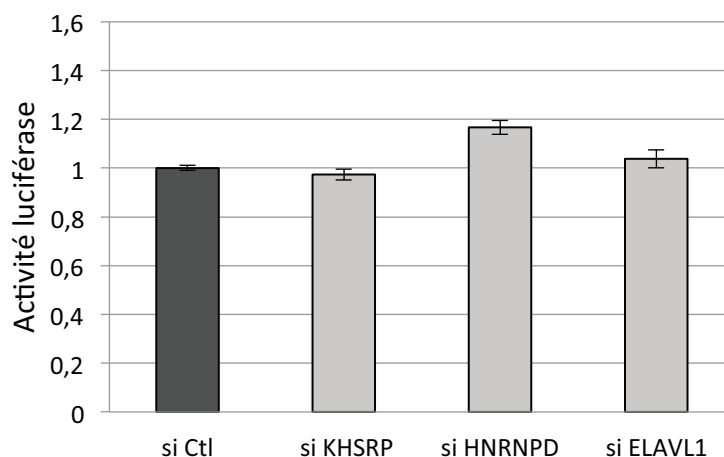
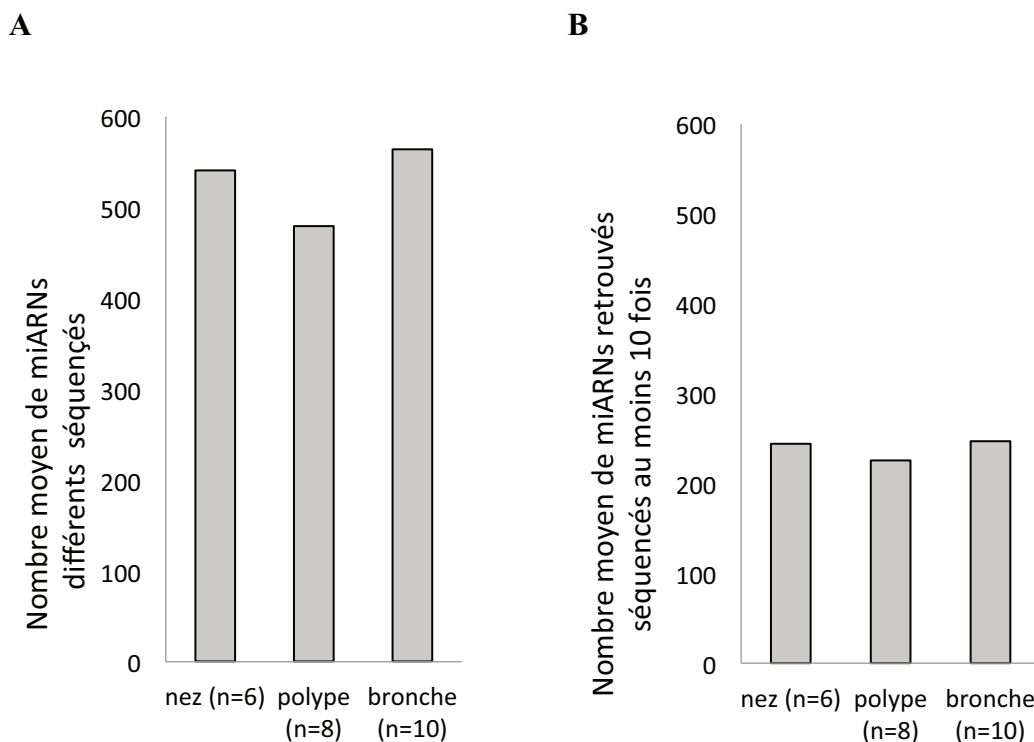


Figure 9 : Effet des siARNs dirigés contre les transcrits codant les ARE-BP KHSRP, HNRNPD et ELAVL1 sur la région 3'UTR *CFTR* dans la lignée Beas-2B (n = 18).

CONCLUSION : L'exploration du miRNome par TLDA a ainsi permis d'identifier miR-100* qui a une action répressive marquée sur la région 3'UTR *CFTR*.

Comparaison du profil des miARNs entre différents épithéliums CF et non-CF par séquençage Illumina.

Au vu de l'évolution des approches permettant d'analyser le profil d'expression des miARNs et afin d'obtenir une vision globale de leur dérégulation dans des échantillons issus du tractus respiratoires, différents miRNomes ont été réalisés. Pour cette étude, l'expression des miARNs a été évaluée dans des épithéliums pseudo-stratifiés de type ALI, obtenus à partir de cellules nasales (Dr. Raphaël Chiron), de polypes nasaux (Dr. Emmanuelle Brochiero, Québec) et de biopsies bronchiques (Epithelix), et issus de patients CF et de contrôles non-CF. A partir d'ARNs totaux, une librairie d'ADNc a été réalisée grâce à l'utilisation d'un kit TruSeq Small RNA (Illumina). Les échantillons ont ensuite été séquencés. Les données obtenues par séquençage ont été analysées par des outils bioinformatiques disponibles sur internet (sRNAbench). Comme l'illustre la **figure 10**, 530 miARNs différents, en moyenne, ont été identifiés dans chaque modèle cellulaire. Parmi eux, environ 240 ont été séquencés plus de 10 fois.



Figures 10 : Données de séquençage. A- Nombre moyen de miARNs séquencés. B- Nombre de miARNs séquencés au moins 10 fois.

Après normalisation des données (Reads Per Millions, RPM), les miARNs les plus exprimés dans les 3 modèles ont pu être identifiés. **Les figures 11, 12 et 13** montrent l'expression des 30 miARNs les plus exprimés dans chaque échantillon analysé.

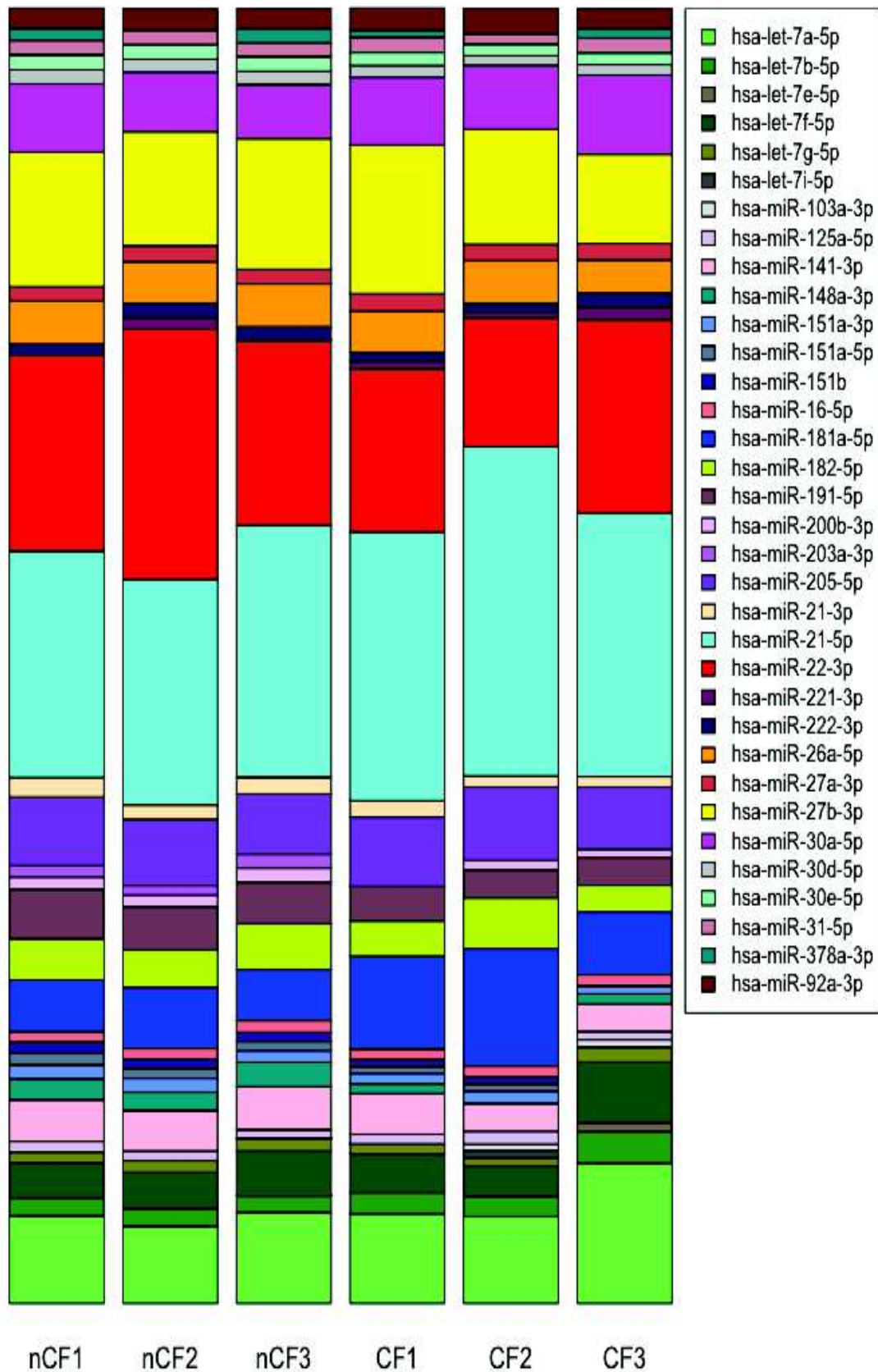


Figure 11 : Représentation des 30 miARNs les plus exprimés dans les cultures ALI nasales (n=6). Une couleur est attribuée à chaque miARN. Plus la surface colorée est étendue, plus le miARN est représenté.

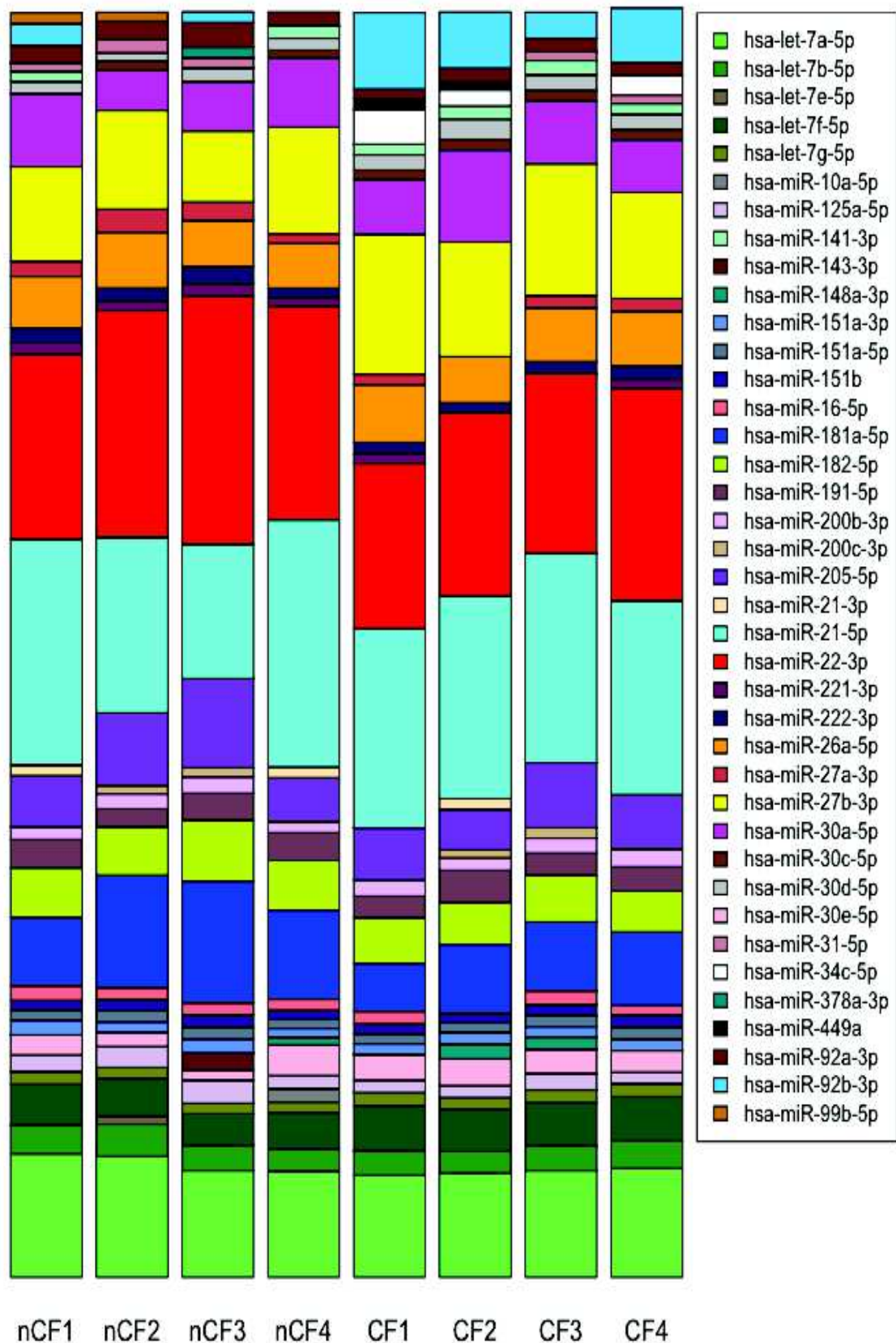


Figure 12 : Représentation des 30 miARNs les plus exprimés dans les cultures ALI issues de polypes (n=8). Une couleur est attribuée à chaque miARN. Plus la surface colorée est étendue, plus le miARN est représenté.

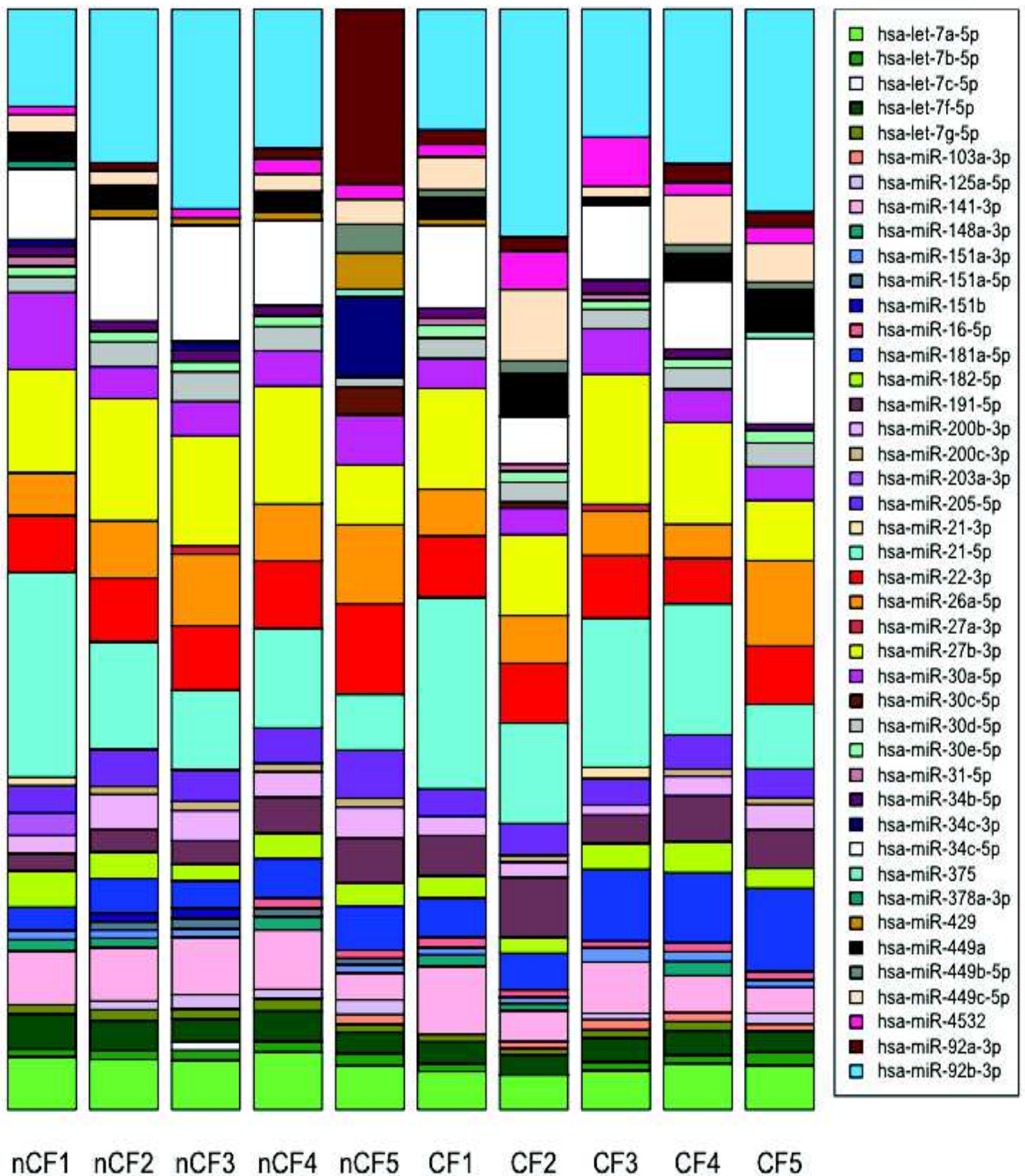


Figure 13 : Représentation des 30 miARNs les plus exprimés dans les cultures ALI bronchiques (n=10). Une couleur est attribuée à chaque miARN. Plus la surface colorée est étendue, plus le miARN est représenté.

De manière globale, 12 miARNs sont retrouvés dans tous les échantillons (n=24) fortement exprimés (**tableau 1**). Ces miARNs représentent environ 70% des miARNs séquencés dans les cultures issues de polypes et de cellules nasales, et 50 % des miARNs identifiés dans les cultures issues de bronches.

	Nasal non-CF (n=3)	Nasal CF (n=3)	Polype non-CF (n=4)	Polype CF (n=4)	Bronchique non-CF (n=5)	Bronchique CF (n=5)
hsa-let-7a-5p	5,83	7,37	7,97	7,36	3,96	3,23
hsa-let-7f-5p	2,65	3,03	2,55	3,04	2,21	1,79
hsa-miR-21-5p	16,10	20,08	13,67	14,07	8,54	10,19
hsa-miR-22-3p	14,41	11,30	15,23	12,94	5,36	4,59
hsa-miR-26a-5p	2,93	2,71	3,46	3,70	4,80	4,11
hsa-miR-27b-3p	8,69	8,23	6,47	8,60	8,02	7,55
hsa-miR-30a-5p	4,15	4,90	4,03	4,57	3,57	2,68
hsa-miR-141-3p	2,87	2,22	1,31	1,72	3,92	3,41
hsa-miR-182-5p	2,84	2,62	3,63	3,05	1,98	1,82
hsa-miR-191-5p	3,08	2,11	1,77	1,76	2,29	3,41
hsa-miR-181a-5p	3,74	6,37	6,81	4,53	2,62	4,77
hsa-miR-205-5p	4,45	4,77	4,47	3,70	2,80	2,38
Total %	71,73	75,72	71,37	69,04	50,08	49,94
Autres miARNs	28,27	24,28	28,63	30,96	49,92	50,06

Tableau 1 : Les 12 miARNs communs les plus exprimés dans les cultures ALI. Le % est calculé en fonction du nombre de RPM (Reads Per millions) total pour chaque groupe.

Les premières observations indiquent que les miARNs miR-22-3p et miR-21-5p sont fortement exprimés dans les cellules issues des voies aériennes supérieures (nez et polype). A l'inverse, les miARNs miR-92-3p et miR-449a sont plus fortement exprimés dans les bronches. De plus, parmi les 30 miARNs les plus exprimés, sont retrouvés les miARNs miR-34b-5p, miR-34c-3p, miR-449-b-5p, miR-449b-5p, miR-449c-5p et miR-4532 dans les modèles bronchiques (**figure 13**), non présents dans cette catégorie dans les modèles nasaux et polypes (**figures 11 et 12**). De manière intéressante, certains de ces miARNs sont impliqués dans la ciliogenèse (Marcet *et al.* 2011).

Comparaison des données du TLDA avec les données du miRseq.

Dans un premier temps, le profil d'expression des miARNs identifiés dans les cultures nasales par les approches de type TLDA (n=5) et miRSeq (n=3), a été comparé. La surexpression des miARNs 27b-3p, 27b-5p et 942-5p n'est pas confirmée. Cependant, de manière similaire aux données du TLDA, miR-100* (miR-100-3p) et miR-146a-5p sont retrouvés surexprimés chez les CF pour au moins 2 échantillons sur 3 (RPM moyen).

	non-CF1	non-CF2	non-CF3	MOY	CF1	CF2	CF3	MOY
hsa-miR-27b-3p	90848,8	78500,8	93048,5	87466,0	62719,5	81462,8	103694,0	82625,4
hsa-miR-27b-5p	152,1	158,3	164,1	158,2	129,2	137,8	150,1	139,1
hsa-miR-100-3p	3,5	0,0	0,0	1,2	2,0	5,4	8,9	5,5
hsa-miR-146a-5p	777,8	804,3	1390,7	990,9	1265,0	1098,9	1478,2	1280,7
hsa-miR-942-5p	17,3	8,0	4,5	9,9	1,0	0,0	1,8	0,9

Tableau 2 : Nombre de RPM (Reads Per millions) des miARNs identifiés par le TLDA.

Recherche des miARNs dérégulés entre CF et non-CF par miRseq.

L'ensemble des miARNs dérégulés dans chaque modèle est résumé dans le **tableau 3** (données sur les bronches), le **tableau 4** (données sur les polypes) et le **tableau 5** (données sur les cellules nasales). Aucun miARN commun, dérégulé à la fois dans les 3 modèles d'épithélium CF, n'a été identifié (analyse réalisée par le logiciel sRNAbench, FDR (False Discovery Rate) <0,05). Cependant, lorsque les différents modèles cellulaires sont comparés deux par deux, plusieurs miARNs communs dérégulés sont retrouvés. Ces dérégulations sont récapitulées sur la **figure 14**.

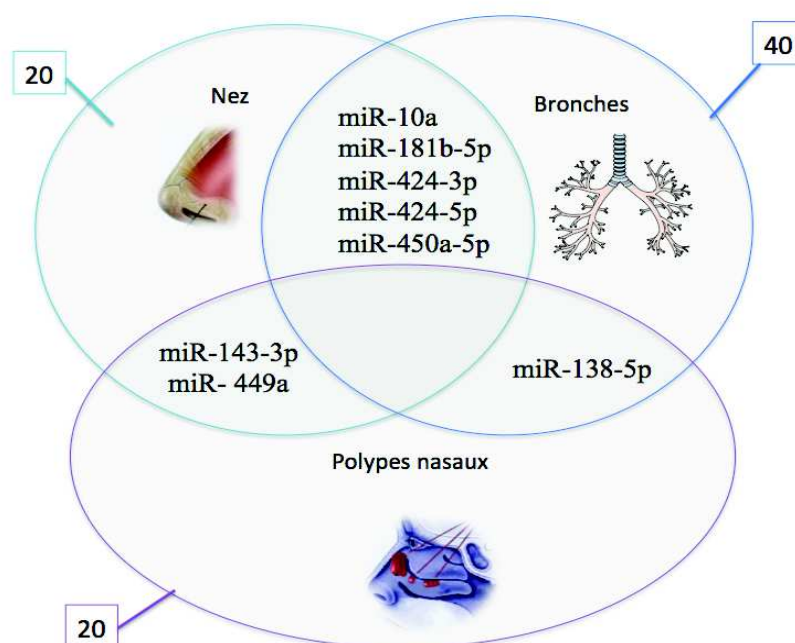


Figure 14 :

Les miARNs dérégulés en commun (sRNAbench, FDR <0,05). Tous les miARNs représentés sont surexprimés excepté miR-10a-5p qui est sous-exprimé dans le modèle bronchique.

Les miRNAs dérégulés dans la littérature ont ensuite été recherchés.

◆ *Epithéliums issus de bronches et de polypes & littérature.*

La surexpression de miR-138-5p est retrouvée dans les modèles bronchiques CF et polypes CF (**tableau 3 et 4**). La surexpression de ce miARN a précédemment été décrite dans des cultures ALI issues des voies aériennes d'individus CF (Ramachandran *et al.* 2012) et des brossages bronchiques CF (Oglesby *et al.* 2010).

◆ *Epithéliums issus de cellules nasales et de polypes & littérature.*

La surexpression de miR-143-3p déjà décrite dans les brossages bronchiques CF (Oglesby *et al.* 2010), est retrouvée dans les modèles issus de cellules nasales et de polypes (**tableau 4 et 5**). De manière intéressante, ce miARN est incluse dans le même cluster que miR-145 (base de donnée USCS).

◆ *Epithéliums issus de bronches & littérature.*

Dans les modèles ALI bronchiques CF, la sous-expression de miR-362-5p et miR-365a-3p ainsi que la surexpression de miR-450a-5p, miR-135b-5p ont été identifiées (**tableau 3**). Ces dérégulations de miARNs ont également été rapportées dans des brossages bronchiques (Oglesby *et al.* 2010).

◆ *Epithéliums issus de polypes & littérature.*

Dans les modèles polypes CF (**tableau 4**), une expression plus marquée de miR-190b est observée. Cette dérégulation a déjà été décrite dans des cultures ALI issues des voies aériennes (Ramachandran *et al.* 2013).

◆ *Epithéliums issus de cellules nasales & littérature.*

Les miARNs miR-193b-3p et miR-450a-5p surexprimés dans les brossages bronchiques CF (Oglesby *et al.* 2010), présentent une expression plus marquée dans les cultures nasales CF comparé aux cultures non-CF (**tableau 5**).

miARNs dérégulés bronches	FDR	non CF1		non CF2		non CF3		non CF4		non CF5		RPM moy.	Expression CF	
		RPM	non CF1 RPM	RPM	non CF2 RPM	RPM	non CF3 RPM	RPM	non CF4 RPM	RPM	non CF5 RPM			
hsa-miR-9-5p	8,7E-44	1793,6	1942,27	2056,78	1473,14	597,85	1572,73	0	7,88	0	1,55	2,07	2,3	↘
hsa-miR-138-5p	5,52E-12	3,64	0	9,53	1,92	0	3,02	52,05	107,67	191,77	80,51	53,78	97,16	↗
hsa-miR-424-5p	5,61E-08	0	0	3,81	0	0	0,76	36,74	7,88	20,46	23,23	26,89	23,04	↗
hsa-miR-424-3p	0,00000135	1,21	0	0	0	0	0,24	15,31	10,5	7,67	9,29	26,89	13,93	↗
hsa-miR-4485-3p	0,00000281	32,72	41,14	18,11	49,87	83,32	45,03	251,06	341,38	227,57	113,03	200,63	226,73	↗
hsa-miR-9-3p	0,0000152	4,85	24,93	38,12	23,02	15,76	21,34	0	2,63	0	0	0	0,53	↘
hsa-miR-10a-5p	0,0000048	196,33	560,99	1587,86	673,27	179,02	639,49	101,04	49,89	107,39	122,32	132,38	102,6	↘
hsa-miR-542-3p	0,0001	0	0	0	0	0	0	18,37	7,88	12,78	7,74	2,07	9,77	↗
hsa-miR-450a-5p	0,0002	0	0	0	0	0	0	6,12	10,5	2,56	7,74	14,48	8,28	↗
hsa-miR-450b-5p	0,0005	1,21	0	0	0	0	0,24	3,06	13,13	5,11	10,84	4,14	7,26	↗
hsa-miR-127-3p	0,0026	27,87	95,99	106,75	55,63	619,24	181,1	27,56	15,76	28,13	18,58	49,64	27,93	↘
hsa-miR-3065-3p	0,004	27,87	29,92	41,94	26,85	18,01	28,92	165,33	26,26	143,19	86,71	74,46	99,19	↗
hsa-miR-135b-5p	0,0045	196,33	147,1	122	274,3	227,43	193,43	70,42	99,79	102,28	49,55	33,09	71,03	↘
hsa-miR-153-3p	0,0066	8,48	26,18	32,41	28,77	14,64	22,1	6,12	5,25	7,67	1,55	2,07	4,53	↘
hsa-miR-500a-3p	0,005	152,7	134,64	129,62	143,86	201,54	152,47	76,54	86,66	40,91	54,19	57,91	63,24	↘
hsa-miR-4284	0,0087	4,85	13,71	9,53	15,35	10,13	10,71	61,23	44,64	63,92	43,35	4,14	43,46	↗
hsa-miR-181b-5p	0,0092	485,97	861,43	733,88	1210,35	1625,79	983,48	1555,34	1462,68	3280,57	2299,31	3470,71	2413,72	↗
hsa-miR-362-5p	0,0092	27,87	13,71	11,44	26,85	31,53	22,28	0	7,88	5,11	4,65	8,27	5,18	↘
hsa-miR-136-3p	0,0118	6,06	27,43	10,48	7,67	15,76	13,48	0	2,63	0	6,19	2,07	2,18	↘
hsa-miR-365a-3p=hsa-miR-365b-3p	0,0157	21,81	41,14	39,08	40,28	37,15	35,89	21,43	10,5	10,23	13,94	12,41	13,7	↘

Tableau 3 : Les miARNs dérégulés dans le modèle bronchique (FDR <0,05). 10 miARNs sont sous-exprimés et 10 miARNs sont surexprimés chez les CF.

miARNs dérégulés polypes	FDR	non CF1 RPM	non CF2 RPM	non CF3 RPM	non CF4 RPM	RPM moy.	non CF1 RPM	non CF2 RPM	non CF3 RPM	non CF4 RPM	RPM moy.	Expression CF
hsa-miR-449c-5p	8,93E-08	594,17	185,02	129,95	401,48	327,66	4009,56	4986,57	1707,57	2246,1	3237,45	↗
hsa-miR-449a	6,54E-07	979,41	271,63	129,95	605,36	496,59	7701,06	5941,09	2596,18	3250,46	4872,1975	↗
hsa-miR-34c-5p	6,54E-07	2115,52	1842,4	504,53	2067	1632,4	24478,36	11354,4	4560,73	13808,36	13550,4625	↗
hsa-miR-34b-3p	1,1E-06	65,29	39,37	30,58	54,37	47,403	696,01	349,48	110,48	420	393,9925	↗
hsa-miR-92b-3p	4,44E-06	15275,47	4995,7	7208,7	5342,7	8205,6	53890,57	39321,97	18281,33	38402,89	37474,19	↗
hsa-miR-34c-3p	6,24E-05	42,44	23,62	38,22	24,05	32,083	432,2	147,4	67,25	197,83	211,17	↗
hsa-miR-34b-5p	0,0001	274,23	165,34	53,51	181,92	168,75	1992,62	941,44	329,03	846,09	1027,295	↗
hsa-miR-449b-5p	0,0002	75,09	23,62	0	122,33	55,26	976,66	953,33	216,15	301,31	611,8625	↗
hsa-miR-1180-3p	0,0005	32,65	35,43	15,29	27,18	27,638	170,26	104,6	64,84	103,48	110,795	↗
hsa-miR-92b-5p	0,0009	6,53	0	15,29	7,32	7,285	87,94	42,79	21,61	48,7	50,26	↗
hsa-miR-212-5p	0,0025	9,79	19,68	30,58	5,23	16,32	0	1,19	0	0	0,2975	↘
hsa-miR-449b-3p	0,0048	6,53	0	0	5,23	2,94	35,55	28,53	19,21	12,17	23,865	↗
hsa-miR-548i	0,0055	1962,08	232,26	542,75	215,38	738,12	86,07	43,98	271,39	45,65	111,7725	↘
hsa-miR-1246	0,0055	6,53	0	0	1,05	1,895	63,61	26,15	4,8	15,22	27,445	↗
hsa-miR-143-3p	0,0069	6,53	7,87	0	0	3,6	7,48	34,47	28,82	48,7	29,8675	↗
hsa-miR-138-1-3p	0,0069	1338,52	3818,6	11627	2227	4752,8	422,85	424,36	264,18	2240,02	837,8525	↘
hsa-miR-138-5p	0,009	352,59	216,52	374,57	32,41	244,02	404,14	895,09	1174,41	846,09	829,9325	↗
hsa-miR-190b	0,0149	13,06	7,87	45,87	8,36	18,79	87,94	82,02	21,61	66,96	64,6325	↗
hsa-miR-3929	0,016	6,53	7,87	45,87	2,09	15,59	0	1,19	0	0	0,2975	↘
hsa-miR-3177-3p	0,044	6,53	7,87	15,29	4,18	8,4675	0	1,19	0	0	0,2975	↘

Tableau 4 : Les miARNs dérégulés dans le modèle polype (FDR <0,05). 5 miARNs sont sous-exprimés et 15 miARNs sont surexprimés chez les CF.

miARNs dérégulé nez	FDR	non CF1 RPM	non CF2 RPM	non CF3 RPM	RPM moy.	non CF1 RPM	non CF2 RPM	non CF3 RPM	RPM moy.	non CF1 RPM	non CF2 RPM	non CF3 RPM	RPM moy.	Expression CF
hsa-miR-203a-3p	5,08E-07	7860,48	6554,26	9755,15	8056,63	2119,81	1905,87	1915,18	1980,28667	1915,18	1905,87	1915,18	1980,28667	↗
hsa-miR-424-5p	0,0000489	1,49	11,19	1,73	4,803333333	23,24	67,1	36,35	42,23	36,35	67,1	36,35	42,23	↗
hsa-miR-143-3p	0,0000591	31,33	38,38	24,2	31,30333333	107,24	77,98	498,73	227,9833333	107,24	77,98	498,73	227,9833333	↗
hsa-miR-193b-3p	0,0000779	295,44	276,63	184,94	252,3366667	543,36	1253,05	505,8	767,4033333	543,36	1253,05	505,8	767,4033333	↗
hsa-miR-148a-5p	0,0003	398,4	278,22	395,81	357,4766667	98,31	48,96	100,96	82,7433333	98,31	48,96	100,96	82,7433333	↘
hsa-miR-6510-3p	0,0008	53,72	52,77	38,03	48,17333333	16,09	3,63	5,05	8,256666667	16,09	3,63	5,05	8,256666667	↘
hsa-miR-424-3p	0,0008	1,49	3,2	0	1,563333333	8,94	19,95	12,12	13,67	8,94	19,95	12,12	13,67	↗
hsa-miR-181d-5p	0,0008	46,26	79,95	34,57	53,59333333	168,01	106,99	134,27	136,4233333	168,01	106,99	134,27	136,4233333	↗
hsa-miR-10a-5p	0,0008	4,48	4,8	3,46	4,246666667	19,66	50,77	13,12	27,85	19,66	50,77	13,12	27,85	↗
hsa-miR-181a-5p	0,0008	35748,18	41871,14	35394,41	37671,2433	64606,07	82986,07	44320,78	63970,9733	64606,07	82986,07	44320,78	63970,9733	↗
hsa-miR-137	0,0037	4,48	4,8	1,73	3,67	8,94	18,13	30,29	19,12	8,94	18,13	30,29	19,12	↗
hsa-miR-152-5p	0,0064	46,26	39,97	50,12	45,45	12,51	5,44	13,12	10,35666667	12,51	5,44	13,12	10,35666667	↗
hsa-miR-4508	0,0062	5,97	0	0	1,99	19,66	29,01	5,05	17,90666667	19,66	29,01	5,05	17,90666667	↗
hsa-miR-450a-5p	0,0065	0	0	0	0	8,94	1,81	8,08	6,276666667	8,94	1,81	8,08	6,276666667	↗
hsa-miR-4492	0,0062	2,98	1,6	1,73	2,103333333	19,66	23,57	4,04	15,75666667	19,66	23,57	4,04	15,75666667	↗
hsa-miR-184	0,0062	267,09	446,12	335,31	349,5066667	67,92	9,07	109,04	62,01	67,92	9,07	109,04	62,01	↗
hsa-miR-4532	0,0071	332,74	399,75	134,82	289,1033333	421,82	1405,38	471,48	766,2266667	421,82	1405,38	471,48	766,2266667	↗
hsa-miR-4326	0,0071	7,46	3,2	19,01	9,89	0	0	0	0	0	0	0	0	↗
hsa-miR-181b-5p	0,0096	1715,94	2627,14	1659,27	2000,783333	3928,63	3980,39	2047,44	3318,82	3928,63	3980,39	2047,44	3318,82	↗
hsa-miR-455-3p	0,0119	62,67	44,77	38,03	48,49	73,28	88,86	136,29	99,47666667	73,28	88,86	136,29	99,47666667	↗
hsa-miR-375	0,0119	164,13	172,69	656,8	331,2066667	87,58	5,44	59,57	50,86333333	87,58	5,44	59,57	50,86333333	↘
hsa-let-7i-5p	0,0138	2579,87	2406,48	2748,17	2578,17333	3186,87	5102,87	3400,28	3896,67333	3186,87	5102,87	3400,28	3896,67333	↗
hsa-miR-147b	0,0142	64,16	119,92	32,84	72,30666667	175,16	237,55	95,91	169,54	175,16	237,55	95,91	169,54	↗
hsa-miR-23a-5p	0,0186	35,81	35,18	17,28	29,42333333	55,41	47,15	82,79	61,78333333	55,41	47,15	82,79	61,78333333	↗
hsa-let-7b-5p	0,0204	12832,22	11856,51	11727,27	12138,6667	14978,11	13818,02	22823,69	17206,6067	14978,11	13818,02	22823,69	17206,6067	↗
hsa-miR-148a-3p	0,0204	14294,5	12531,28	17009,3	14611,6933	7076,18	3996,71	7272,04	6114,97667	7076,18	3996,71	7272,04	6114,97667	↘
hsa-miR-181a-2-3p	0,0221	398,4	444,52	335,31	392,7433333	559,45	1263,93	396,77	740,05	559,45	1263,93	396,77	740,05	↗
hsa-miR-125b-1-3p	0,0262	17,91	25,58	12,1	18,53	51,83	21,76	44,42	39,33666667	51,83	21,76	44,42	39,33666667	↗
hsa-miR-654-3p	0,0267	26,86	15,99	5,19	16,01333333	5,36	0	1,01	2,123333333	5,36	0	1,01	2,123333333	↘
hsa-miR-181c-5p	0,0275	1132,52	1253,61	827,91	1071,34667	1774,85	1494,23	1237,75	1502,27667	1774,85	1494,23	1237,75	1502,27667	↗
hsa-miR-3605-5p	0,0275	2,98	1,6	1,73	2,103333333	7,15	12,69	7,07	8,97	7,15	12,69	7,07	8,97	↗
hsa-miR-449a	0,0311	19,4	11,19	93,33	41,30666667	7,15	5,44	6,06	6,216666667	7,15	5,44	6,06	6,216666667	↘
hsa-miR-29a-5p	0,0326	1,49	7,99	3,46	4,313333333	17,87	18,13	8,08	14,69333333	17,87	18,13	8,08	14,69333333	↗
hsa-miR-24-2-5p	0,0333	182,04	209,47	153,83	181,78	282,4	297,4	246,34	275,38	282,4	297,4	246,34	275,38	↗
hsa-let-7e-5p	0,0339	3437,84	3151,61	3270,15	3286,53333	3671,25	4047,48	5892,95	4537,22667	3671,25	4047,48	5892,95	4537,22667	↗
hsa-miR-125b-5p	0,0339	434,21	409,34	278,27	373,94	618,43	391,69	663,3	557,8066667	618,43	391,69	663,3	557,8066667	↗
hsa-miR-21-5p	0,0416	156305,39	154922,89	175179,67	162135,983	187097,73	232576,06	185451,68	201708,49	187097,73	232576,06	185451,68	201708,49	↗
hsa-miR-223-3p	0,0419	7,46	14,39	17,28	13,04333333	3,57	1,81	1,01	2,13	3,57	1,81	1,01	2,13	↘
hsa-miR-942-5p	0,0425	4,48	7,99	17,28	9,916666667	1,79	0	1,01	0,933333333	1,79	0	1,01	0,933333333	↘
hsa-miR-203a-5p	0,043	19,4	25,58	48,4	31,12666667	10,72	5,44	8,08	8,08	10,72	5,44	8,08	8,08	↘

Tableau 5 : Les miARNs dérégulés dans le modèle nasale (FDR <0,05). 11 miARNs sont sous-exprimés et 29 miARNs sont surexprimés chez les CF.

La dérégulation des miARNs a ensuite été confirmée par RT q-PCR. C'est le cas de la perte d'expression de miR-9-5p dans les cellules bronchiques (**figure 15**) et de la surexpression des miARNs miR-449c-5p et miR-449a dans le modèle polype (**figure 16**).

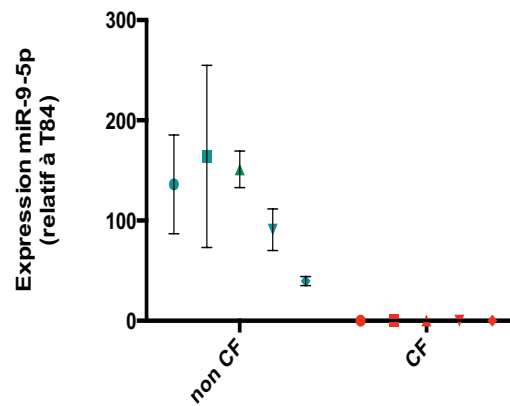


Figure 15 : Confirmation de la perte d'expression de miR-9-5p dans les cultures ALI CF comparé aux cultures ALI non-CF issues de bronches. L'expression a été normalisée par rapport à l'ARN *SNORD44* (ΔCt). L'ARN des cellules T84 a été utilisé comme calibrateur.

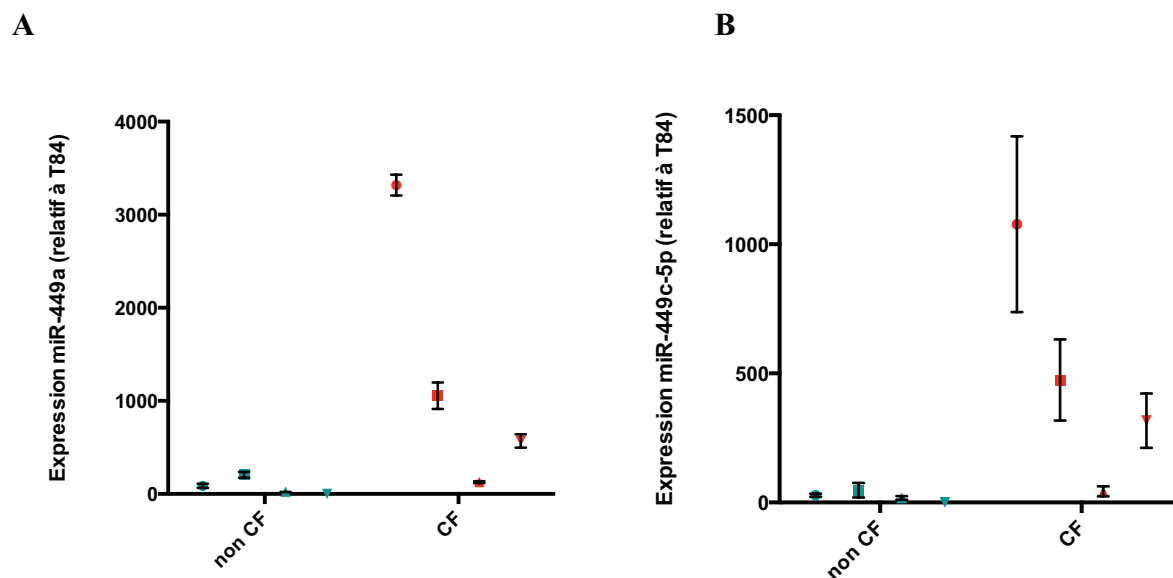
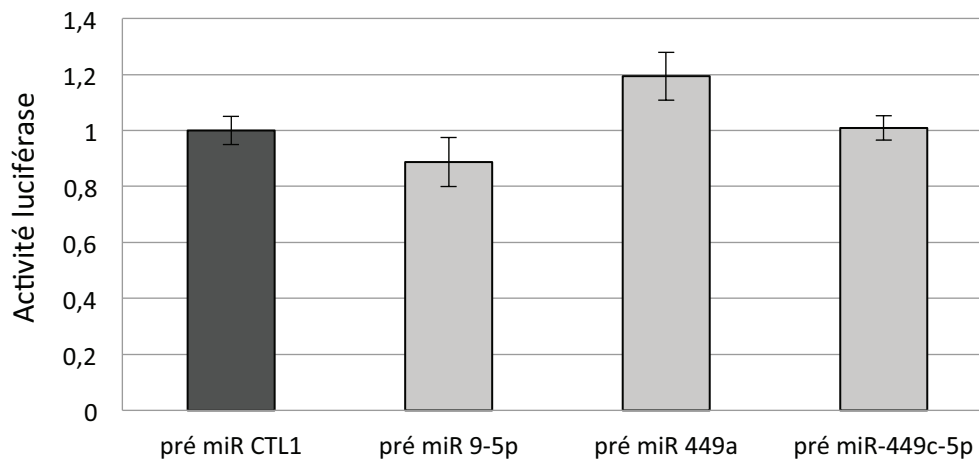


Figure 16 : Confirmation de la surexpression de miR-449a (A) et miR-449c-5p (B) dans les cultures ALI CF comparé aux cultures ALI non-CF issues de polypes. L'expression a été normalisée par rapport à l'ARN *SNORD44* (ΔCt). L'ARN des cellules T84 a été utilisé comme calibrateur.

Rôle des miARNs dérégulés et identification de leurs cibles

Dans un premier temps, l'étude des miARNs dont la dérégulation a été validée par RT-qPCR, a été initiée. Une recherche des motifs de fixation de ces petits ARNs non codants sur la région 3'UTR *CFTR* a été effectuée et l'effet (direct ou indirect) de plusieurs précurseurs correspondant aux miARNs dérégulés, a été testé. Les résultats d'expériences de vecteurs rapporteurs indiquent que miR-9-5p, miR-449a et miR-449c-5p présentés précédemment, n'induisent pas de diminution significative de l'activité luciférase (**figure 18**). Ces miARNs n'ont donc pas d'action sur la région 3'UTR *CFTR*.



Figures 18 : Effet de précurseurs mimant l'effet des miARNs 9-5p, 449a et 449c-5p sur la région 3'UTR *CFTR*, dans la lignée Beas-2B (n=27).

La recherche de cibles des miRNAs dérégulés a permis d'observer que miR-449a (clé dans la ciliogenèse) et miR-9-5p cibleraient le transcrite codant la protéine ZFP36, une ARE-BP connu également sous le nom de TTP (prédictions miRanda, Dai *et al.* 2015). De plus, une variation du taux de ZFP36 est observée dans les modèles CF (Bhattacharyya *et al.* 2011). Ainsi, dans un premier temps, l'effet de cette ARE-BP sur la région 3'UTR du gène *CFTR* a été évalué par l'utilisation d'un siARN dirigé contre le transcrite *ZFP36* (Silencer Select pre-designed siRNA, Ambion, 50nM). Dans la lignée Beas-2B, la co-transfection d'un siARN et d'un vecteur rapporteur contenant la séquence codante du gène luciférase sous le contrôle de la région 3'UTR du gène *CFTR*, induit une diminution de l'activité luciférase, suggérant un rôle stabilisateur de la protéine ZFP36 sur le transcrite *CFTR* (**figure 18**).

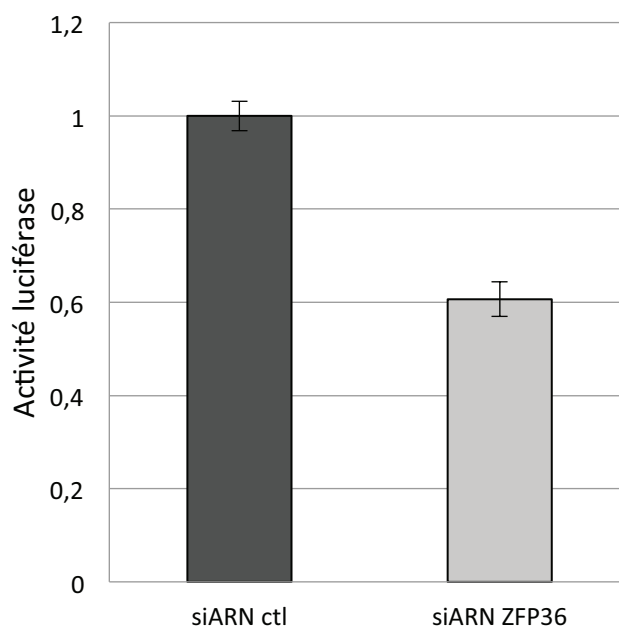


Figure 18 : Effet des siARNs dirigés contre le transcrits *ZFP36* sur la région 3'UTR *CFTR* dans la lignée Beas-2B (n = 45).

L'effet du siARN sur le taux d'ARNm et de protéines *ZFP36* a été validé. Des expériences de vecteurs rapporteurs après surexpression de cette ARE-BP pour confirmer son effet, sont en cours d'évaluation (utilisation de vecteurs d'expression). L'impact de *ZFP36* sur le transcrit *CFTR* est également en cours d'analyses. Afin d'évaluer le lien entre miR-9, miR-449 et cette ARE-BP, le taux de *ZFP36* après introduction de ces miARNs devra être étudié.

Enfin, afin d'identifier d'autres cibles potentielles, différents gènes modificateurs décrits chez des individus ayant une atteinte pulmonaire (Gallati 2014) ont été analysés par le logiciel StarBase qui regroupe les prédictions de 5 outils bioinformatiques (Miranda, PicTar, PITA, TargetScan et RNA22). Parmi les miARNs retrouvés dérégulés dans le modèle bronchique, 7 d'entre eux (miR-9-5p, miR-10a-5p, miR-135b-5p, miR-138-5p, miR-181-5p, miR-424-5p et miR-542-3p) sont prédits pour potentiellement agir sur les transcrits de gènes modificateurs (tableau 6).

Locus	Gène Modificateur	miARNs	Site de fixation du miARN	Site de prédiction
12q13.13	KRT18	miR-9-5p	chr12:53346591-53346613[+]	M
19q13.41	PPP2R1A	miR-424-5p miR-542-3p	chr19:52729323-52729329[+] chr19:52729524-52729530[+]	M/ Pc/ T M/ T
9q34.11	PPP2R4	miR-9-5p miR-9-5p miR-181b-5p	chr9:131909935-131909941[+] chr9:131911056-131911078[+] chr9:131910756-131910779[+]	M/ PT/ T R M
15q15.1	SNAP23	miR-9-5p	chr15:42823988-42823994[+]	Pc/ T
7q11.23	STX1A	miR-424-5p miR-424-5p	chr7:73114290-73114296[-] chr7:73114676-73114681[-]	M/ Pc/ PT/ T Pc
5q31-q32	DCTN4	miR-9-5p miR-10a-5p miR-135b-5p miR-138-5p	chr5:150090315-150090338[-] chr5:150090542-150090563[-] chr5:150089612-150089638[-] chr5:150089458-150089483[-]	M M M M
7q31.1	IFRD1	miR-9-5p miR-135b-5p miR-181b-5p miR-542-3p	chr7:112115841-112115863[+] chr7:112116074-112116099[+] chr7:112116001-112116023[+] chr7:112116022-112116043[+]	M M M M
4q13.3	IL-8	miR-181b-5p	chr4:74608321-74608344[+]	M
11p13	PDHX	miR-135b-5p miR-181b-5p	chr11:35017294-35017301[+] chr11:35017369-35017389[+]	M/ PT M

Tableau 6 : miARNs dérégulés dans le modèle bronchique et prédits pour agir sur les transcrits de gènes modificateurs décrits dans la mucoviscidose. Abréviations : M = Miranda; Pc = PicTar; PT=PITA; T = TargetScan; R = RNA22.

Le rôle de ces miARNs sur les transcrits *KRT18* (*keratin 18*), *PPP2R1A* (*protein phosphatase 2 regulatory subunit A*), *PPP2R4* (*protein phosphatase 2A activator regulatory subunit 4*), *SNAP23* (*synaptosomal-associated protein*), *STX1A* (*syntaxin 1A*), *DCTN4* (*dynactin 4*), *IRF1* (*immune response deficient 1*), *Il8* (*interleukin-8*) et *PDHX* (*pyruvate dehydrogenase complex, component X*) est en cours d'analyse.

4.3.4. Discussion

L'implication des miARNs dans la mucoviscidose est maintenant bien établie (Oglesby *et al.* 2010, Bhattacharyya *et al.* 2011, Ramachandran *et al.* 2013). Les études réalisées ont permis d'identifier de nombreux miARNs, avec une expression différentielle dans des modèles CF (**figure 1**); des dérégulations mise en évidence par des approches ciblées de type TLDA. La détermination de ces miARNs a permis également d'envisager la correction de leur taux pour améliorer le taux de protéines CFTR dans des cultures CF (Ramachandran *et al.* 2012). Il semble maintenant indispensable de poursuivre la recherche des miARNs dérégulés chez les patients CF, d'autant plus que les seules approches utilisées ne permettent pas d'étudier l'expression de l'ensemble des miARNs décrits dans les bases de données.

Dans un premier temps, le même type d'étude que celle publiée par les autres équipes (approche ciblée de type TLDA), a été réalisé sur des cultures ALI issues de cellules nasales CF et non-CF. Cette étude a permis d'identifier un nouveau miARN : miR-100*. Bien que son expression soit faible, des expériences ont montré que l'inhibition de ce miARN module l'expression d'un gène rapporteur sous contrôle de la région 3'UTR *CFTR* (**figure 5**). A présent, il reste à évaluer l'impact de ce miARN sur le taux endogène de l'ARNm *CFTR*. Etant donné que cette approche ciblée n'a pas permis de mettre en évidence les miARNs dérégulés dans la littérature, une approche plus globale, sans *a priori*, a ensuite été envisagée.

Ce travail présente pour la première fois une étude de miRNome par séquençage, sur différents types d'épithéliums issus d'individus CF et non-CF. Cette approche a permis d'identifier des miARNs non présents sur les cartes microfluidiques. Le profil d'expression des miARNs retrouvés les plus exprimés dans les différents modèles cellulaires, est assez proche entre le modèle nasal et le modèle polype qui partagent une même origine tissulaire (**figure 12 et 13**). Parmi les 30 miARNs les plus exprimés dans chaque échantillon, 12 miARNs sont retrouvés chez tous les individus. Il serait à présent intéressant de réaliser un miRseq directement sur des tissus bronchiques, des polypes nasaux et des cellules nasales sans les cultiver en ALI, afin de savoir si ces miARNs fortement exprimés sont caractéristiques d'une culture ALI ou des voies aériennes. Cette étude permettrait également de définir si les modèles ALI (nécessaires pour tester des molécules), issus de cellules nasales ou de polypes, peuvent être des modèles alternatifs aux cellules bronchiques.

L'étude comparative des différents modèles, n'a pas permis de retrouver des miARNs dérégulés à la fois dans les 3 modèles ALI CF (FRD<0.05). Cependant, lorsque la comparaison est focalisée uniquement sur 2 modèles, les résultats indiquent que certains miARNs dérégulés sont aussi retrouvés par d'autres équipes dans des brossages ou des cultures ALI issus des voies aériennes. Par exemple, la surexpression de miR-138-5p est observée dans les modèles bronchiques et polypes CF. Ce miARN module l'expression du gène *CFTR* en agissant sur le transcrite *SIN3A*, un répresseur transcriptionnel qui permet le recrutement d'histones désacétylase (HDAC1, HDAC2) (Ramachandran *et al.* 2012). Les données obtenues renforcent donc l'importance de ce régulateur dans la physiopathologie CF. D'autre part, la dérégulation de miARNs décrits pour être impliqués dans l'inflammation (Bhattacharyya *et al.* 2011; Oglesby *et al.* 2010; Irene K. Oglesby *et al.* 2015a) n'a pas été retrouvée. Ces données sont en accord avec le fait que les prélèvements issus de biopsies présentent une inflammation marquée du tissu, contrairement aux modèles ALI où la dérégulation des marqueurs de l'inflammation tels que l'IL-8 n'est pas retrouvée (résultats non-présentés).

Par les approches de séquençage, la dérégulation des miARNs miR-9 et miR-449 a également été montrée. La recherche de cibles des miARNs dérégulés a permis d'identifier un nouveau régulateur du gène *CFTR* : la protéine ZFP36 (TTP). Cette protéine est décrite comme une déadénylase qui est sous exprimée chez les individus CF (Bhattacharyya *et al.* 2013). Ainsi cette sous-expression permet la stabilisation du transcrite codant la cytokine IL-8. Si son rôle de protéine stabilisatrice du transcrite *CFTR* est confirmée, la diminution du taux de cette protéine chez les individus CF entraînerait donc à la fois une augmentation du taux de la molécule pro-inflammatoire IL-8 et une déstabilisation des transcrits *CFTR*. Quelques études décrivent une diminution du taux du transcrite *CFTR* chez les individus CF (Oglesby *et al.* 2013, Megiorni *et al.* 2013). De plus, une étude a montré que ZFP36 participe à la stabilisation du transcrite *HIF-1* (Fahling *et al.* 2012). Le lien entre ZFP36 et le facteur HIF qui agit sur la transcription du gène *CFTR* nécessite de nouvelles investigations. A présent, il serait intéressant d'évaluer le taux des transcrits ZFP36 dans nos modèles ALI CF en comparaison avec les cultures non-CF. Etant donné que les épithéliums CF présentent des différences morphologiques (Adam *et al.* 2014), il pourrait également être envisagé d'évaluer l'effet des miARNs dérégulés sur les différents marqueurs d'un épithélium différencié.

Enfin pour identifier de nouvelles cibles, des études bioinformatiques ont été réalisées. Les prédictions montrent que des miARNs dérégulés dans les cultures bronchiques auraient

pour cibles des transcrits de gènes qualifiés de modificateurs dans la mucoviscidose. L'utilisation de molécules pour restaurer le taux des miARNs dérégulés, devrait permettre de confirmer leur rôle sur les gènes modificateurs prédits et de définir l'importance de ces miARNs dans la physiopathologie CF.

5. DISCUSSION GÉNÉRALE

▣ La première partie de ce manuscrit montre qu'identifier des éléments régulateurs du gène *CFTR*, peut permettre d'envisager le développement de nouveaux outils à visée thérapeutique pour corriger l'expression du gène *CFTR*. *In vivo*, inhiber l'action des miARNs par des oligonucléotides antisens (AONs) spécifiques au transcrit *CFTR* (molécules nommées MBBOs dans l'étude pour miRNA-binding blocker oligonucleotides) semblait plus approprié que d'inhiber la fixation d'un facteur répresseur sur une région promotrice. Une autre approche qui pourrait être envisagée, bien que moins spécifique, serait de stabiliser des transcrits codant des facteurs activateurs du gène *CFTR*, via l'utilisation d'oligonucléotides. Ainsi un pool d'AONs stabilisant à la fois le gène *CFTR* et les transcrits de ses activateurs transcriptionnels, pourrait être administré aux cellules. Cependant, l'inhibition ou la surexpression de facteurs régulateurs posent un problème majeur car il est rare qu'un facteur régulateur ne possède qu'une cible et il est donc difficile de définir précisément les conséquences de l'inhibition ou de la surexpression de facteurs régulateurs. Une approche plus ciblée, bien que parfois moins efficace, peut paraître moins risquée en terme d'effets secondaires indésirables et plus adaptée.

Une des perspectives du travail sera ensuite de tester les molécules MBBOs *in vivo*. Le modèle animal de laboratoire le plus facile pour l'expérimentation est le modèle murin, néanmoins les souris homozygotes p.Phe508del (et *Cfr*^{-/-}) ne souffrent pas d'atteintes pulmonaires. Le porc et le furet sont des modèles plus appropriés car ils se rapprochent au mieux des conditions pathologiques retrouvées chez l'humain, notamment par la présence d'une inflammation pulmonaire (Cutting 2014). Cependant, leur disponibilité et leur manipulation reste compliquées. Les souris transgéniques β ENaC-Tg qui surexpriment le canal sodique ENaC seraient un bon modèle alternatif. En effet, les voies respiratoires de ces animaux sont caractérisées par une augmentation de l'absorption du sodium entraînant une inflammation chronique liée à l'accumulation de neutrophiles. Il est également décrit que l'épithélium respiratoire de ces souris présente une métaplasie des cellules caliciformes et que les voies aériennes sont obstruées par l'accumulation de mucus (Zhou *et al.* 2011). Bien que les souris p.Phe508del ne présentent pas d'inflammation, elles peuvent être utilisées pour tester les MBBOs afin d'évaluer leur efficacité au niveau du système digestif. Chez la souris, la région 3'UTR du transcrit *CFTR* ne contient pas de site de fixation pour mmu-miR-145, cependant un site de fixation pour mmu-miR-101 (très conservé) et mmu-miR-384 est présent. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'impact d'AONs inhibant la fixation de mmu-miR-101 et mmu-miR-384, seul ou de manière combinée, chez les souris β ENaC-Tg.

Différents modes opératoires pourraient être envisagés, des injections intrapéritonéales, intraveineuses ou par l'utilisation d'aérosols. L'administration par traitement intranasal de nanoparticules biodégradables (PLGA/PBAE/MPG) pour corriger le gène *CFTR* peut être efficace chez la souris (McNeer *et al.* 2015). Le dernier essai de thérapie génique a montré que les liposomes cationiques (PGL67A) sont également des candidats prometteurs pour l'introduction d'un transgène (Alton *et al.* 2015). Néanmoins, l'administration d'AONs inhibant la fixation des miARNs semblent moins difficile que ces approches de thérapie génique et de "genome engineering" où le système de réparation nécessite de pénétrer le noyau. Des études réalisées sur des souris montrent que l'administration par aérosol d'un AON dilué dans une solution saline ou de l'eau est efficace (Crosby *et al.* 2007; Cannon *et al.* 2009). Enfin, une étude d'essai clinique de phase I, dont l'objectif est de faire inhaler un oligonucléotide antisens simple brin directement dans une solution aqueuse est actuellement en cours (molécule QR-010, ProQRTherapeutics, source : ClinicalTrials.gov). L'introduction de MBBOs nécessiterait néanmoins des mises au point (concentration, nombre d'administrations, solutions d'administration) car les MBBOs doivent pouvoir traverser le mucus visqueux ainsi que la barrière épithéliale.

▣ La deuxième partie de ce manuscrit montre que le séquençage complet du locus *CFTR* permet de scanner des zones non explorées de ce gène. Cette approche a mené à l'identification de nouvelles mutations non détectées par des techniques de diagnostic classique. Pour certains patients étudiés, la seconde mutation n'a toujours pas été identifiée. L'exploration des régions régulatrices incluant les extrémités 5' et 3' du gène pourrait révéler des éléments *cis*-régulateurs essentiels pour moduler l'expression du gène *CFTR*. En effet, sur ces régions se fixent des facteurs nécessaires au maintien d'une conformation particulière du gène (Gheldof *et al.* 2010). Il serait également intéressant d'étudier les variations de séquences présentes au niveau des différents DHS décrits pour évaluer leur influence sur l'expression du gène *CFTR*. Enfin, cette étude souligne l'importance d'explorer les régions introniques profondes car ces séquences peuvent renfermer des mutations sévères de classe I telle que la mutation c.1680-883A>G présentée dans ce travail. L'identification de cette mutation d'épissage qui induit l'insertion d'un exon cryptique altérant la séquence normale du transcrit, a permis d'envisager l'utilisation d'oligonucléotide antisens (AONs). L'utilisation des AONs (nommés TSB dans cette étude pour Target Site blockers) peut être adaptée en

fonction de la mutation d'épissage présente chez le patient, pour une thérapie personnalisée. Ces molécules permettent ainsi d'envisager de nouveaux traitements pour des individus porteurs de mutations de classe I où les molécules actuellement proposées (correcteurs et potentiateurs) ne sont pas efficaces. L'impact des variants d'épissage et l'utilisation d'AONs peuvent être testés sur des minigènes dans des lignées cellulaires. Ces dernières présentent de nombreux avantages : une bonne adhérence, une division cellulaire rapide, un nombre de passages illimité et une facilité de congélation/décongélation. Les lignées permettent d'avoir du matériel biologique en grande quantité, de multiplier facilement les expériences et de réaliser de nombreuses mises au point avant de réaliser des tests sur des cultures primaires précieuses. La 2ème étape est de tester les AONs sur des cultures primaires en interface air liquide, issues de patients CF porteurs de la mutation ciblée, ce qui est un avantage majeur pour l'étude de nouvelles thérapeutiques. Leur obtention est cependant difficile (rare) et leur culture délicate (matériel en faible quantité, problèmes d'adhésion, problèmes de contaminations si le patient est infecté, nombre de divisions cellulaires très limité). Une des approches pour pallier à la faible quantité de matériel biologique obtenue lors des prélèvements chez les patients, serait l'utilisation de cellules souches afin de pouvoir réaliser une multitude de tests pour optimiser l'utilisation des TSBs et tester plusieurs designs et plusieurs conditions. En effet, le nombre de cupules ALI obtenu après 2 mois de culture limite grandement le nombre de tests. Les cellules pluripotentes ont la capacité de se différencier dans tous les lignages cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires : mésoderme, endoderme et ectoderme. En culture, il est possible de différencier les cellules hES en épithélium respiratoire composé de cellules basales, de cellules ciliées et de cellules à mucus (Wong *et al.* 2015). Il a été montré dans ce modèle, la présence d'une protéine CFTR mature (glycosylée, bande C) et fonctionnelle. La culture des cellules hES posent cependant des problèmes éthiques liés à la destruction des embryons humains. La communauté scientifique utilise plus aisément des iPCs (cellules pluripotentes induites), c'est-à-dire des cellules génétiquement reprogrammées. En utilisant le même protocole de culture que pour les hES, il est maintenant possible de différencier des IPs issues de patients CF porteurs de la mutation p.Phe508del en épithélium respiratoire (Wong *et al.* 2012). Obtenir un modèle représentatif de l'épithélium d'un patient CF facilement manipulable et accessible reste encore un réel challenge.

▣ Enfin, la dernière partie de ce manuscrit présente l'étude du profil d'expression des miARNs dans des modèles CF et non CF. Le travail présenté compare des épithéliums

reconstitués en ALI issus de cultures nasales, bronchiques, ou de polypes. Une des grandes difficultés dans l'étude de la mucoviscidose, est de définir le bon modèle cellulaire. De plus, l'étude de ce gène est d'autant plus complexe que le tissu pulmonaire présente une faible expression du gène *CFTR* comparé aux autres tissus. Enfin, un changement du profil d'expression des gènes observé chez les CF, pourrait résulter de la présence de la protéine CFTR mal conformée accumulée dans le réticulum et/ ou de l'absence de sa fonctionnalité en temps que canal. Il a été émis l'hypothèse que les mutations du gène *CFTR*, qui au niveau protéique altère l'efflux d'ions Cl⁻ et HCO₃⁻, entraînent des perturbations du microenvironnement cellulaire (modification du PH intracellulaire et de la concentration ionique) puis du profil d'expression des miARNs. Ainsi l'altération de l'expression de ces petits ARNs non codants changerait l'expression de divers gènes impliqués dans des voies de signalisation très variables (métabolisme, inflammation ...), pouvant influencer la sévérité de la maladie chez les patients CF (Xu *et al.* 2011, Chan *et al.* 2014). En particulier, une étude visant à évaluer le rôle du canal CFTR au stade préimplantatoire corrobore cette hypothèse. En effet un traitement avec l'inhibiteur inh-172 sur des embryons au stade 2 cellules inhibe l'expression de miR-125b, suggérant ainsi l'implication du canal CFTR dans l'expression de cet ARN non codant (Xie *et al.* 2013). Il a également été montré que l'inhibition de l'activité du canal modifie le taux de miARNs intracellulaire dans des cultures bronchiques (Oglesby *et al.* 2013). En vue de ces observations, il serait intéressant de réaliser le profil des miARNs après un traitement avec l'inhibiteur inh-172 afin d'identifier les différents miARNs dérégulés par l'absence de fonctionnalité du canal CFTR. Identifier ces régulateurs pourrait fournir de nouvelles pistes sur des gènes cibles dérégulés dans la physiopathologie CF. En plus des expériences avec l'inhibiteur 172, il pourrait être envisagé également de cultiver des cellules de patients porteurs de mutations de classe I et III (absence d'activité du canal) et de comparer le profil de miARNs avec des individus sains. Ce travail pourrait fournir de nouvelles informations sur le rôle de la protéine CFTR dans la physiopathologie CF.

L'identification des miARNs dérégulés chez les CF pourrait également aboutir à la détermination de marqueurs de la sévérité de l'épithélium CF. Le profil d'expression des miARNs peut être étudié de manière non invasive, à partir des fluides biologiques tels que le sang, la salive ou encore les urines. Des études ont montré que ces petits ARNs non codants peuvent être des biomarqueurs de la progression de pathologies humaines tels que les cancers colorectaux (Hofsli *et al.* 2013) ou les adénocarcinomes (Yu *et al.* 2010). L'étude de la dérégulation des miARNs dans les fluides biologiques, collectés chez des patients CF

présentant un phénotype modéré ou sévère, pourrait permettre de déceler des marqueurs de l'atteinte pulmonaire.

▣ Identifier des motifs régulateurs visant à contrôler l'expression du gène *CFTR*, en utilisant divers modèles d'étude, peut *in fine* permettre de cibler des éléments régulateurs pour moduler l'abondance de la protéine CFTR. Il est décrit que 5% de transcrits *CFTR* sauvages (Ramalho *et al.* 2002, Amaral 2005) ou 5% de protéines fonctionnelles (Sosnay *et al.* 2011, voir annexe 6.2) permettent d'avoir un phénotype atténué. Des expériences de co-cultures réalisées à partir de cellules primaires bronchiques CF et non CF ont mis en évidence que 10% de cellules exprimant un gène *CFTR* sauvage est suffisant pour restaurer les paramètres physiologiques telles que la conductance des ions Cl⁻ et Na⁺ ainsi qu'une sécrétion d'IL-8 normale (Dannhoffer *et al.* 2009). Bien qu'il soit évident que ces données ne tiennent pas en compte de l'état inflammatoire de l'épithélium, moduler l'expression du taux de transcrits *CFTR* reste une piste à ne pas négliger.

Dans ce manuscrit, deux modes d'utilisation des AONs sont présentés :

- Des bloqueurs de type MBBO qui se fixent spécifiquement sur le transcrit *CFTR* et qui empêcheraient la fixation d'éléments déstabilisateurs tels que les miARNs. Plus précisément, ces molécules stabilisatrices se fixent à l'extrémité 3' non traduite du transcrit *CFTR* et peuvent corriger l'activité du canal CFTR dans des cultures CF.
- Le deuxième type de bloqueur nommé TSB correspond à un AON qui se fixe à proximité de la mutation intronique ciblée, afin d'empêcher la reconnaissance des éléments *cis* et *trans* de l'épissage et ainsi bloquer l'inclusion d'exons cryptiques. Cette stratégie déjà utilisée pour d'autres pathologies et qui nécessite de nouveaux designs pour chaque mutation intronique à cibler, semble efficace pour le gène *CFTR*.

La connaissance des mécanismes de régulation de ce gène semble être une voie prometteuse pour rechercher de nouvelles cibles pour la mucoviscidose.

6. ANNEXES

Role of Non-coding RNAs in Cystic Fibrosis

Jessica Varilh, Jennifer Bonini and
Magali Taulan-Cadars

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/60449>

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is a common autosomal recessive disorder, caused by mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (*CFTR*) gene. *CFTR* gene expression is tightly controlled by transcriptional and post-transcriptional regulatory factors, resulting in complex spatial and temporal expression patterns. Here, we describe an overview of the findings about the contribution of ncRNAs, especially miRNAs, in physiological *CFTR* gene expression and in CF. Determination of mechanisms governing its expression is essential for developing new CF therapies. ncRNAs, including lncRNAs and miRNAs, could also contribute to CF progression and severity and their dysregulation in CF opens new perspectives for patient follow-up and treatment.

Keywords: *CFTR* gene expression, Cystic Fibrosis, non-coding RNA, lncRNA, miRNA

1. Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is a common autosomal recessive disorder. Although in its classical form CF affects several organs, including the pancreas and the gastrointestinal and reproductive tracts, its morbidity is mainly due to pulmonary damages. This disorder is caused by mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (*CFTR*) gene. This gene displays great mutational heterogeneity, depending on the ethnic and phenotypic background, with almost 2,000 referenced *CFTR* alterations (genet.sickkids.on.ca/). The most common mutation

is the p.Phe508del, whereas other mutations, located both in coding and non-coding regions, are rare or private. The p.Phe508del mutation induces aberrant protein folding, leading to endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation, atypical intracellular trafficking and reduced stability of the CFTR protein at the apical membrane. Dysfunction or lack of the CFTR protein causes an obstructive lung disease characterized by impaired ion transport in the airway epithelium, accumulation of sticky mucus in the air space and chronic airway inflammation. Physiological *CFTR* expression is tightly controlled by transcriptional, post-transcriptional, translational and post-translational regulatory mechanisms, resulting in complex spatial and temporal expression patterns. Notwithstanding the importance of *CFTR* transcriptional regulation [1-3], *CFTR* expression can be modulated through other mechanisms. Indeed, epigenetic changes, such as DNA methylation or histone acetylation, also influence *CFTR* gene expression in different tissues [4-7]. Post-transcriptional controls also regulate its expression, for instance via the usage of upstream open reading frames (uORFs) encoded within the *CFTR* 5'UTR [8] and the 3'UTR that controls *CFTR* mRNA stability through ARE sequences (AU-rich elements) [9]. An emerging area of research is focusing on the role played by non-coding RNAs (ncRNAs), such as microRNAs (miRNAs), in *CFTR* gene expression. Starting from 2011, a few studies have shown the involvement of miRNAs in the physiological control of the complex spatio-temporal expression pattern of *CFTR* mRNA [10,11], including a recent work by our group [3]. Moreover, the implication of long non-coding RNAs (lncRNAs) and miRNAs in human diseases is well documented [12], including in inherited disorders [13] and lung diseases [14-17]. However, only few studies, described below, have hitherto been carried out on the role of ncRNAs in CF. This chapter is an overview of the findings about the role of ncRNAs in physiological *CFTR* gene expression and in CF.

2. What are non-coding RNAs?

Large expanses of the genome are transcribed into RNAs, but only a small portion of these RNAs encode proteins [18,19]. Many fundamental cellular processes rely on conserved ncRNAs, particularly on ribosomal RNAs (rRNAs), the ribosome RNA components that allow mRNA translation into proteins (Figure 1). Other roles are the transport of amino acids via transfer RNAs (tRNAs) and mRNA splicing through the implication of small nucleolar RNAs (snoRNAs). miRNAs and their crucial role as key modulators of post-transcriptional gene regulation were discovered more than 20 years ago [20]. In the last few years, lncRNAs have been identified as new modulators of key biological processes [21-23, 18]. Currently, ncRNAs are divided in two classes, based on their length; long ncRNAs (lncRNAs, > 200 nt) and short ncRNAs (<200 nt), such as miRNAs, small nucleolar RNAs (snoRNAs) and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) [24].

Ribosomal RNA (rRNA) and transfer RNA (tRNA) are the most represented ncRNAs in humans. Long non-coding RNAs (lnc or long ncRNA) are longer than 200 nt and are subdivided in five categories based on their genomic localization: pRNA (promoter-associated RNA), eRNA (enhancer-associated RNA), gsRNA (gene body-associated RNA), lincRNA (intergenic RNA) and NAT (Natural Antisense Transcript). Short non-coding RNAs (short

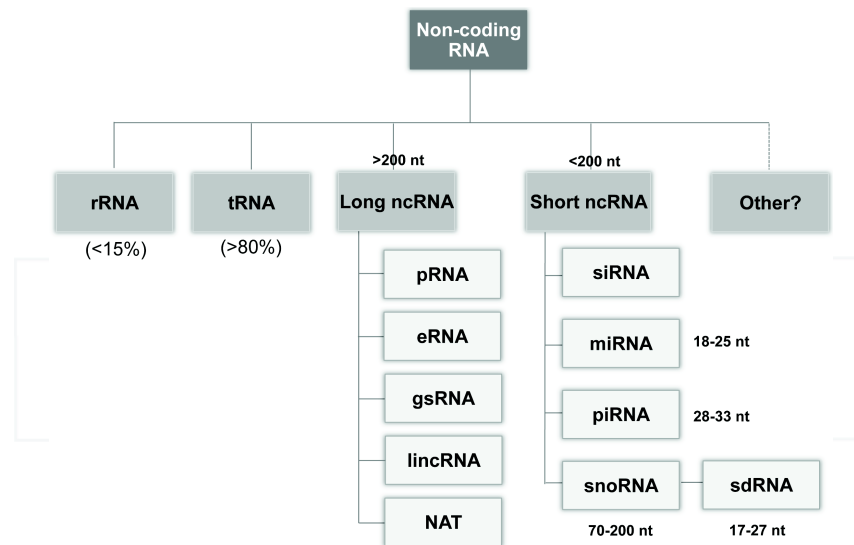


Figure 1. Non-coding RNAs.

ncRNAs) are smaller than 200 nt and are subdivided in four classes based on their size and function: siRNA (small interfering RNA), miRNA (microRNA), piRNA (PIWI-interacting RNA), snoRNA (small nucleolar RNA) and derived snoRNA (sdRNA).

2.1. Long non-coding RNAs

lncRNAs include all ncRNAs longer than 200 nt (except rRNA and tRNA). They constitute the bulk of the non-coding transcriptome [25].

2.1.1. lncRNA biogenesis

It is thought that most lncRNAs originate within a 2-kb region surrounding the Transcription Start Site (TSS) of protein-coding genes (65% of lncRNAs overlap with a promoter and are called pRNAs), or map to enhancer regions (19%; named eRNAs), or derive from antisense transcripts that overlap with annotated gene bodies (5%, called NATs), or are associated with the bodies of protein-coding genes (gsRNA, gene body-associated lncRNAs) [26, 27]. The remaining lncRNAs originate from more distal (>2kb) unannotated regions (11%) and are commonly referred to as long intervening or intergenic ncRNAs (lincRNAs) [28, 29] (Figure 2).

a-Promoter-associated RNAs (pRNA), b-Enhancer-associated RNAs (eRNA), c-Intronic and gene body-associated (sense) RNAs (gsRNA), d-Natural Antisense Transcripts (NAT), e-Long Intergenic RNAs (lincRNA). In the lower part of the figure are described the main lncRNA functions.

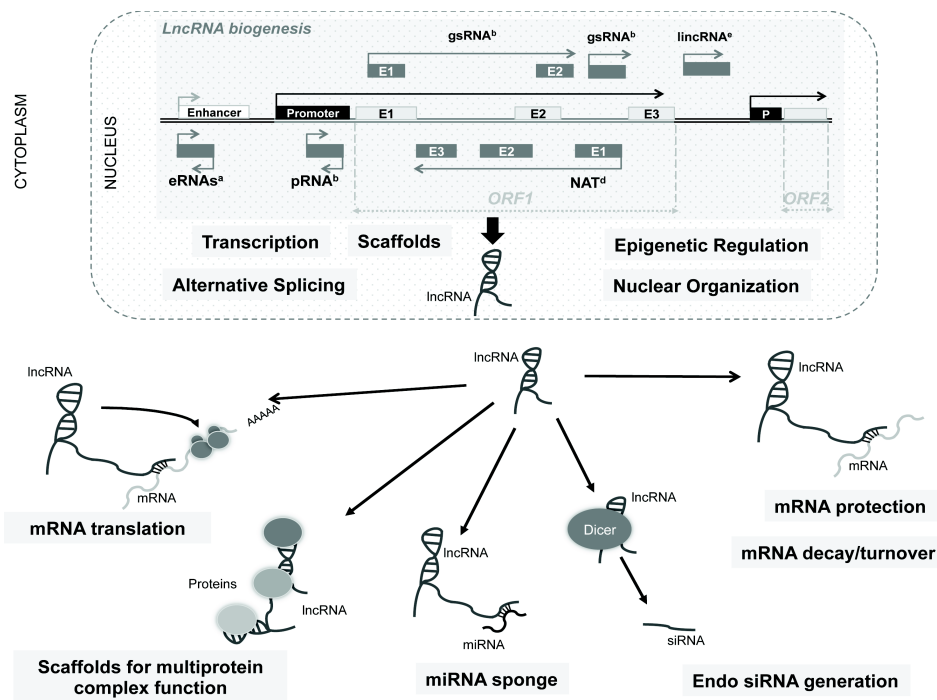


Figure 2. lncRNAs, from biogenesis to functions.

The finding that a large number of lncRNAs arise from loci close to protein-coding genes is consistent with previous genome-wide analyses of lncRNAs [30]. Although all studies agree that the 5' end of lncRNAs, like for mRNAs, is capped by methylguanosine, their splicing status and their 3' end processing have not been fully defined [26]. It is likely that splice site recognition occurs at low frequency at most lncRNA loci and that lncRNAs may be predominantly mono-exonic and non-polyadenylated [26]. Most lncRNAs are not translated [28] and their localization is predominantly nuclear [25].

2.1.2. lncRNA functions

lncRNAs have regulatory functions in different biological processes (Figure 2). Many of their functions are related to their capacity to bind to RNA, DNA and proteins. The founding member of the lncRNA family is Xist (~17 kb). Xist originates from the silent X chromosome in female cells and coats this chromosome during the early stages of development to establish epigenetic X inactivation [31]. lncRNAs can be used as indicators of the transcriptional activity of a locus or a gene [19]. Their roles as scaffolds for nuclear processes, guides for ribonucleoprotein complexes or decoys have been described in the literature. Similarly to miRNAs, they can act as activators or repressors of protein expression.

lncRNAs are considered to be more species, tissue and developmental stage-specific than mRNAs [32]. A growing number of studies show that lncRNA deregulation has a role in various diseases [33,34; for reviews: 35,36], including pulmonary disorders. Several reviews have discussed the role of lncRNAs and miRNAs in respiratory diseases [16,17,37] and a recent work reported lncRNA involvement in CF (detailed in section 4.2.1).

2.2. MicroRNAs

2.2.1. miRNA localization and biogenesis

Animal miRNAs derive from the nuclear genome. In humans, the majority of canonical miRNAs are encoded by introns of non-coding or coding transcripts, but some miRNAs are encoded by exonic regions (Figure 3). Often, several miRNA loci are in close proximity, thus constituting a polycistronic transcription unit [38]. Most miRNAs use their host gene transcripts as carriers, but separate transcription from internal promoters remains possible. Generally, miRNAs in the same cluster are co-transcribed. Most miRNA genes located in introns of protein-coding genes share the promoter of the host gene [39]. miRNA genes often have multiple transcription start sites [40]. miRNA loci in intergenic regions apparently have their own transcriptional regulatory elements, thus constituting independent transcription units.

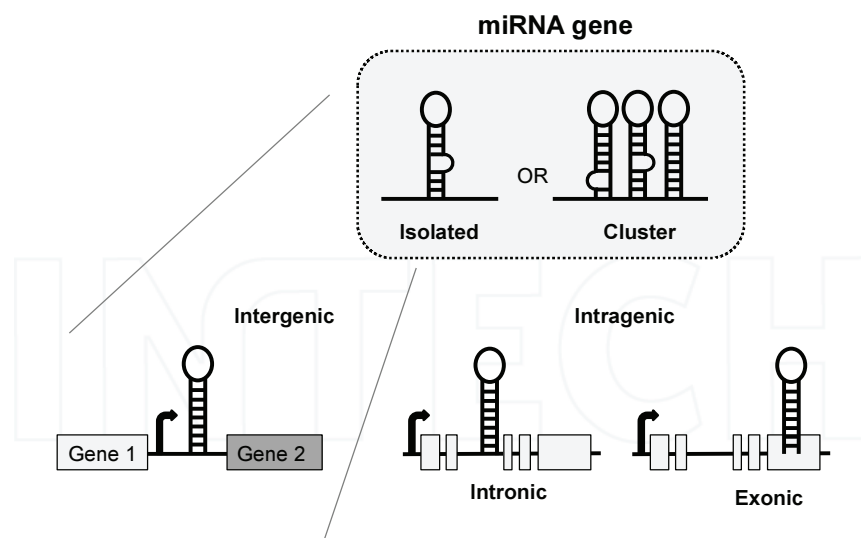


Figure 3. Genomic locations of miRNAs. miRNA genes, isolated or in clusters, are located in intergenic (ex: *miR-494*) or intragenic genome regions, including exons of non-coding (e.g. *miR-155*) or coding (e.g. *miR-985*) genes and introns of non-coding (e.g. the *miR-15a-16-1* cluster) or coding (e.g. *miR-126*) genes.

miRNA biogenesis includes several steps. First, the gene coding for a given miRNA is transcribed by RNA polymerase II into a long primary transcript (pri-miRNA, ranging from 100 nt to several kilobases). Some miRNA genes, especially those located in Alu elements, are transcribed by RNA polymerase III [41]. When several miRNAs are in a cluster, pri-miRNAs can contain multiple miRNAs. Transcription factors, such as p53, MYC, C/EBP, FOXA positively or negatively regulate miRNA transcription [3,42,43]. Epigenetic control, such as DNA methylation and histone modifications also contribute to miRNA gene regulation [44].

Then, several maturation steps are necessary for miRNA processing. Indeed, the long pri-miRNAs (typically over 1kb) contain stem-loop structures in which mature miRNA sequences are embedded. The nuclear RNase III Droscha acts by cropping the stem-loop to release small hairpin-shaped RNAs of 65 nt in length (pre-miRNA) from the pri-miRNAs. To do this, Droscha, together with its cofactor DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8), forms the Microprocessor complex. As Droscha cleavage defines one end of the mature miRNA and thereby determines its specificity, it is important that the Microprocessor complex precisely recognizes and cleaves each pri-miRNA. Importantly, Droscha-mediated processing of intronic miRNAs does not affect splicing of the host pre-miRNA [45]. Multiple auxiliary factors could contribute to pri-miRNA maturation [46]. For example, three primary sequence determinants (the basal UG, CNNC and the apical GUG motifs) contribute to efficient processing of human pri-miRNAs. At least one of these three motifs is present in almost 80% of human miRNAs [46]. The splicing factor SRp20 (also called SRSF3) and the RNA helicase DDX17 bind to the CNNC motif and increase processing of human pri-miRNAs by Droscha. Moreover, the terminal loops of miRNA precursors are enriched in cis-elements that recruit regulatory proteins. For example, the splicing factors HNRPA1 and KSRP bind to the conserved terminal loops of some pri-miRNAs and facilitate Droscha-mediated processing [47-49].

Following Droscha processing, pre-miRNAs are exported in the cytoplasm where they are cleaved by Dicer near the terminal loop, liberating a small RNA duplex. Dicer, like Droscha, belongs to a family of RNase III-type endonucleases that act specifically on double-stranded RNA.

RNA duplexes include two mature miRNAs: one derived from the 5' strand and the other one from the 3' strand of the precursor (e.g. miR-27a-5p and miR-27a-3p). One is also called the 'guide' (miRNA) and is usually more biologically active than the other one (the 'passenger', often referred to as miRNA*). The passenger is normally degraded, but, in some cases, it can be functional [50]. The mature miRNA strand is subsequently incorporated in the RNA-induced silencing complex (RISC, or miRISC for miRNA-containing RISC, or miRNP for microribonucleoprotein), where it directly binds to a member of the Argonaute (AGO) protein family (four AGO members, AGO1 are the most frequently used).

To date, about 1,900 miRNAs (1,881 precursors and 2,588 mature miRNAs; GRCh38 human genome assembly) have been reported in the miRbase database (<http://www.mirbase.org/>). A substantial number of these miRNAs have dubious annotations and for nearly one-third of miRNA loci, there is no convincing evidence concerning the production of authentic miRNAs (miRbase).

2.2.2. miRNA roles

miRNAs are small ncRNAs that can act in the nucleus and in the cytoplasm [51] through binding to RNA, DNA and proteins. They play an important role in the negative regulation of gene expression by base-pairing to partially complementary sites on the target mRNAs, usually in the 3' UTR part. Binding of an miRNA to its target mRNA, within the RISC complex, typically leads to translational repression and exonucleolytic mRNA decay. However, highly complementary targets can be cleaved endonucleolytically.

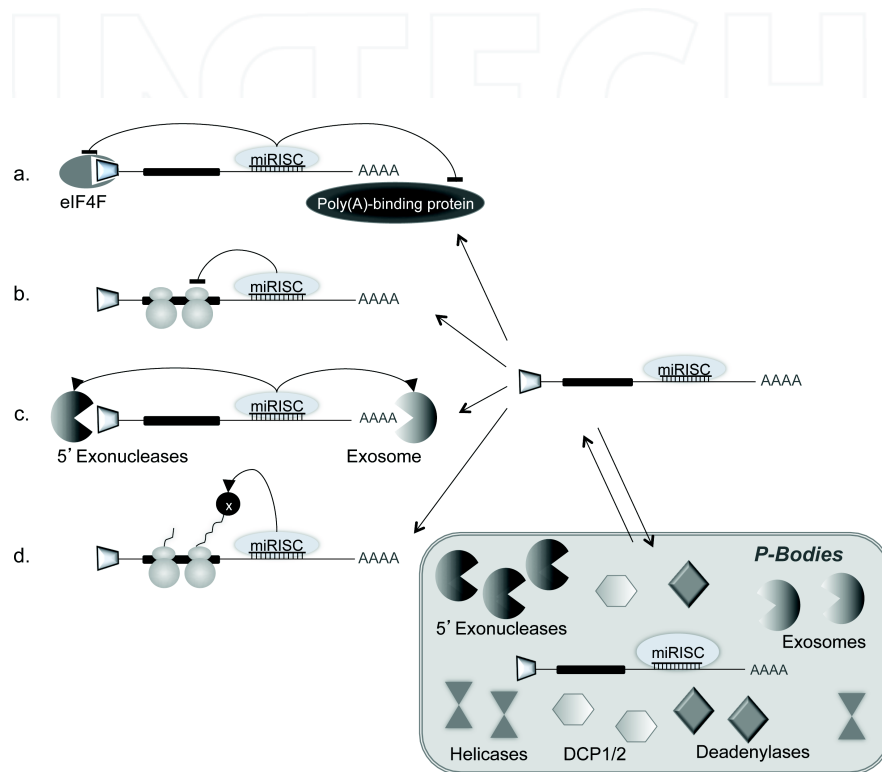


Figure 4. Main miRNA roles. a. Translation block by inhibiting cap and poly(A)-binding protein recognition. b. Elongation inhibition by slowing down elongation or ribosome 'drop-off'. c. Degradation by deadenylation and decapping. d. Proteolysis. Degradation of a nascent peptide. e. mRNA storage in P-bodies that contain exonucleases, RNA helicases, decapping enzymes, DCP1/2, exosomes, deadenylases.

Several miRNAs have a role in lung diseases, such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (see Table 1). The studies reporting the involvement of miRNAs in CF are detailed in section 3.2.2.

Disease	MicroRNAs	Targets	References
Asthma	miR-106a	IL-10	[81]
	miR-21	IL-12	[82]
	miR-133a	RhoA	[83]
	miR-26a	Glycogen synthase kinase 3 β	[84]
	let-7	IL-13	[85]
COPD	miR-181d	Interferon γ , collagen XVI α I	[86]
	miR-30c	Proto-cadherin	[86]
	miR-146a	Prostaglandin E2	[87]
Idiopathic pulmonary fibrosis	miR-21	SMAD7	[88]
	miR-155	KGF	[89]
	miR-let7d	HMGA2	[90]

COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

Table 1. Examples of pulmonary diseases in which miRNAs have a role

3. Role of non-coding RNAs in the physiological regulation of *CFTR* gene expression

As the function of lncRNAs has not been studied yet, we only present findings on the miRNA roles in the regulation of *CFTR* gene expression.

3.1. miRNAs and *CFTR* gene expression

CFTR gene expression is spatially and temporally regulated. Several studies have demonstrated the differential use of transcription start sites, depending on the tissue type or the developmental stage [52-55]. In the lung, *CFTR* transcripts can be detected early during embryo development (12th week of pregnancy) and their level progressively increases up to the 24th week of pregnancy. Thereafter, *CFTR* expression in the airways decreases and is repressed until after birth and remains very low during adult life [56,60]. The changes in *CFTR* protein expression in human foetuses are consistent with *CFTR* mRNA temporal pattern of expression [60]. In a recent study, we showed that miRNAs (miR-101, miR-145, miR-384) regulate the switch from strong foetal to very low *CFTR* expression after birth. Specifically, miR-101 and miR-145 negatively regulate the level of *CFTR* transcripts in adult lung cells, while they have no effect in foetal lung cells. miR-101 directly acts on its cognate site in the 3'UTR-*CFTR* in combination with an overlapping AU-rich element. Other studies showed that *CFTR* expression is also post-transcriptionally regulated by miRNAs, such as miR-145 and miR-494 [10,11]. Gillen *et al.* demonstrated that miR-145 is expressed in primary adult human airway epithelial cells, where *CFTR* expression is low, and directly acts on *CFTR* stability [10]. In addition to its

specific role in mature lung cells, miR-101 decreases luciferase activity in an embryonic kidney cell line [11], whereas it does not affect *CFTR* mRNA stability in pancreatic cell lines [10], suggesting a potential role as a tissue-specific factor.

3.2. Methods to investigate miRNA role in the regulation of *CFTR* gene expression

Different approaches can be employed to investigate miRNA role in the regulation of *CFTR* gene expression, as depicted in Figure 5A.

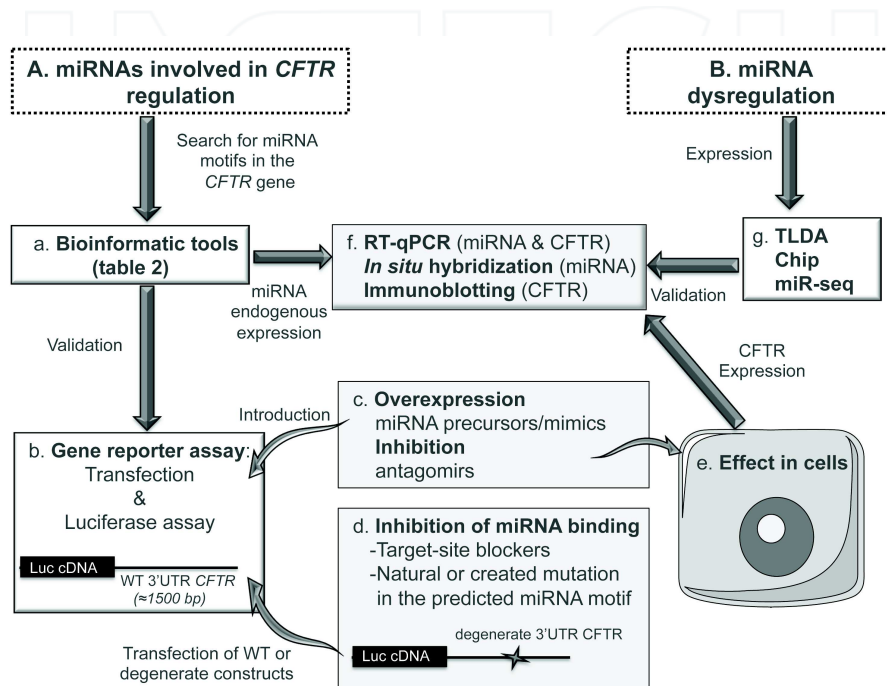


Figure 5. Approaches for miRNA study. A. Strategies used to study the involvement of miRNAs in the regulation of *CFTR* gene expression. B. Strategies to identify miRNAs that are deregulated in CF samples compared to non-CF samples. Chips for global miRNA profiling are commercialized by Agilent, Affimetrix and Exiqon. miR-seq (miRNA sequencing) is usually performed by Illumina platforms. Luc, luciferase; TLDA, TaqMan Array Micro Fluidic Cards (Applied Biosystems); WT, wild type.

3.2.1. Predictive tools are freely available

Predictive tools are necessary to assess the putative presence of miRNA binding motifs. A non-exhaustive list, including information about each program, is proposed in Table 2. Databases collecting all information on miRNAs are listed in Table 3. Although miRBase (<http://www.mirbase.org/>) is the most used database and collects links for several predictive pro-

grams, others exist. These tools have been developed to predict miRNA targets or the miRNAs that putatively bind to a selected gene. Some of them propose the possibility to input several miRNAs and/or several genes to identify integrated networks.

Name	Website	Characteristics	References
TargetScan	http://www.targetscan.org/	Target site prediction for mammals. Secondary structure taken into account.	[91]
miRanda	http://microrna.org/	Target site prediction for human, mouse, rat, fruitfly and nematode. Thermodynamic stability of RNA duplexes taken into account.	[92]
PicTar	http://www.pictar.org/	Algorithm for target-site prediction based on the alignment of 3'UTR with predicted sites. Several databases are used for vertebrates, flies, nematodes.	[93]
RNAhybrid	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/	Tool for finding the minimum free energy hybridization for long and mainly short RNAs, such as microRNAs to one or more given targets.	[94]
PITA	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html	Target-site prediction for human and other species that evaluates the microRNA targets accessibility as a component analysis.	[95]
miRDB	http://mirdb.org/miRDB/	Tool for miRNA target-site prediction and functional annotation based on the mirTarget algorithm for all known human, dog, rat, and chicken transcripts.	[96]
DIANA-microT	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/	Target-site prediction program taking into account both conserved and non-conserved miRNA regulatory elements (MREs) and providing scores as an indication of the expected fold change in protein production.	[97]
miRBase Target	http://www.mirbase.org/	Prediction of target sites based on alignment and conservation. Provides links to other main programs for miRNA target prediction (e.g., TargetScan, PicTar).	[98]
miRTar	http://mirtar.mbc.nctu.edu.tw/human/	Web-based system based on the analysis of conserved sequences (seed or 3' miRNAs) using external prediction tools (TargetScan, miRanda, PITA, RNAhybrid). Analyzes miRNA biological functions using the KEGG pathway to draw a miRNA target interaction network.	[99]
miRNAMap	http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/index.php	Uses the computational tools, miRanda, RNAhybrid, and TargetScan to identify miRNA targets in the 3'UTR of target genes.	[100]

Name	Website	Characteristics	References
MiRonTop	http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index	Identification of miRNAs from DNA microarrays and high-throughput sequencing data. Uses several existing miRNA target prediction approaches.	[101]
MIR@nt@n	http://maia.uni.lu/mironton.php	Integrative approach for searching miRNAs target sites, to build networks including motifs as feedbacks and feedforward loops from lists of molecular actors.	[102]
ProMiR	http://bi.snu.ac.kr/ProMiR/	Prediction of potential conserved and non-conserved microRNAs in a query sequence from 60 to 150 nucleotides and clusters near known or unknown miRNAs in various species.	[103]

Table 2. Free bioinformatics tools for miRNAs

Name	Website	Characteristics	References
miRBase	http://www.mirbase.org/	Collection of annotation, literature, genomic coordinates for human miRNAs and from several other species. From deep sequencing datasets, uses the pattern of mapped reads to assess the confidence in each miRNA annotation.	[98]
miRGen	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/mirgen/	Integrated database collecting relationships between animal miRNAs, genomic annotation sets and miRNA targets to a combination of used target prediction programs.	[104]
miRNAMap	http://miRNAMap.mbc.nctu.edu.tw/	Resource for collecting experimentally verified microRNAs and verified miRNA target genes in human and other metazoan genomes reducing the false positive prediction rate of miRNA target sites. Expression profiles by RT-qPCR of 224 human miRNAs in 18 normal tissues.	[100]
CoGemiR	http://cogemir.tigem.it/	Database offering an overview of the genomic organization and conservation of microRNAs in different metazoan species during evolution.	[105]
miRanda	http://microrna.org/	Atlas of miRNA expression in human, mouse and rat tissues based on small RNA library sequencing.	

Table 3. Free databases for miRNAs

3.2.2. Functional approaches

To evaluate *in vitro* the impact of miRNAs on *CFTR* gene regulation, several approaches can be used (Figure 5 A). a) First of all, *in silico* analysis by using bioinformatics tools can be performed (see 3.2.1). b) The role of specific miRNAs could be assessed *in vitro* by using airway cell lines and luciferase gene reporter assays, in which the luciferase coding sequence is under the control of the 3' UTR of *CFTR*, as previously described [11,3]. c) By transfecting mimics or precursors, miRNAs can be overexpressed and the relative level of luciferase expression reflects the effect of a given miRNA on the 3'UTR-*CFTR*. Inhibitors may also be used to confirm the specific effect of the miRNA under study. d) To validate the direct effect of the identified miRNAs (for instance, miRNA-494 and miRNA-101), the cis element for miRNAs binding in the 3'UTR-*CFTR* can be mutated by site-directed mutagenesis (created mutation). Target-site blockers may also be used to inhibit binding to the tested motif [3]. e) To validate these effects, the endogenous level of *CFTR* mRNA following miRNA overexpression or down-regulation can be assessed using different techniques.

4. Role of non-coding RNAs in CF

4.1. What is the impact of mutations in microRNA target sites on the *CFTR* gene?

4.1.1. Mutations in the 3'UTR of the *CFTR* gene

Assessing the putative impact of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 3'UTR of *CFTR* is essential to define the pathological importance of these cis-regulatory motifs in non-coding regions, especially after the development of Next-Generation Sequencing (NGS) technologies. Recent work identified the SNP c.*1043A>C on the 3'UTR of the *CFTR* gene in one patient with a *CFTR*-related disorder and congenital bilateral absence of vas deferens [61]. This SNP is located in a region predicted to interact with miR-433 and miR-509-3p. Expression analysis demonstrated that the c.*1043A>C mutation increases the affinity for miR-509-3p and slightly decreases that for miR-433. *In vitro*, these two miRNAs reduces *CFTR* protein expression. The authors suggested that the very low expression of miR-509-3p in normal human bronchial epithelial (NHBE) cells could explain the mild phenotype caused by this mutation. Thus, the c.*1043A>C mutation, by acting as a mild *CFTR* mutation that enhances the affinity for an inhibitory miRNA, could represent a novel pathogenic mechanism in CF.

4.1.2. Methods to investigate the impact of *CFTR* gene mutations

Bioinformatics tools, such as miRNA binding site prediction programs (listed in Table 2), could be used to predict whether at a mutated position there is a cis-regulatory motif and whether it corresponds to an miRNA binding site. Moreover, tools like RNAhybrid could allow predicting the binding energy of the mutated motif. *In vitro* luciferase reporter gene assays together with mutagenesis approaches to create degenerate 3'UTR-*CFTR* sequences can be used to study the different variants (Figure 5Ad).

4.2. Deregulation of non-coding RNAs in CF

Clinical manifestations of CF are various including chronic pulmonary inflammation and infection that strongly contribute to the morbidity and mortality of these patients [62]. Over-inflammation precedes chronic infection that is then amplified by pathogens. Notably, the protease–antiprotease balance, which is responsible for lung remodelling, is disrupted in CF airways early in life and then this imbalance is chronically maintained [63]. Pulmonary tissues in patients with CF are usually infected by antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Interleukin-8 (IL-8), IL-6 and Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha) are pro-inflammatory cytokines that are highly expressed in CF lung epithelial cells and allow the recruitment of neutrophils [62]. Lipopolysaccharide (LPS) and IL-1beta, which bind to Toll-like receptor 4 (TLR4) and IL-1R, respectively, are also involved. The identification of the molecular events involved in lung epithelium injury and repair is essential for understanding CF physiopathology. Expression levels of miRNAs physiologically vary greatly among tissues. Recent advances explored their effects on influencing signaling pathways in CF. Identification of deregulated miRNAs may offer possible future directions for clinical applications.

4.2.1. Deregulated lncRNAs in CF

To date, only one publication has reported aberrant expression of specific lncRNAs in CF bronchial epithelium *in vivo* [64]. To establish the lncRNA profiles of CF and non-CF bronchial epithelium, 10 CF and 12 non-CF (controls) bronchial brushing samples were analyzed using a human lncRNA Array v3.0 (ArrayStar). In this way, more than 30586 lncRNAs and 26109 protein coding transcripts were evaluated. Overall, 1063 lncRNAs, most of which were intergenic, were differentially expressed in non-CF and CF bronchial brushing samples. RT-qPCR analysis of the differential expression of well-known ncRNAs (XIST, MALAT1, HOTAIR, and TLR8 antisense) did not confirm the down-regulation of MALAT1 and HOTAIR in CF samples compared to controls. Interestingly, MALAT1 (lnc-SCYL1-1*) and HOTAIR (lnc-SMUG1-7*) have been described as oncogenic lncRNAs in lung cancer (*asterisks meaning the existence of several isoforms).

4.2.2. Deregulated miRNAs in CF

miRNA profiling studies identified various miRNAs with altered expression in CF (summarized in Figure 6). For instance, *in vivo* the expression of miR-145, miR-223 and miR-494 is increased in CF bronchial brushing samples (individuals with at least one p.Phe508del CFTR allele) compared to non-CF controls and correlates with decreased p.Phe508del CFTR expression. Moreover, these three miRNAs inhibit CFTR mRNA expression [65]. These authors also highlighted a relationship between their regulation and CFTR chloride channel activity. Specifically, they showed that treatment with inh-172, a specific inhibitor of the CFTR chloride channel, significantly increases the level of miR-145, miR-223 and miR-494 in 16 HBE14o-respiratory epithelial cells. These data are in agreement with the hypothesis by Wenming Xu *et al.* [66] that CFTR chloride channel alteration affects the miRNA profile. Another study reported that miR-509-3p and miR-494 are increased in well-differentiated primary cultures of human CF but not of non-CF airway epithelia, [67]. Other miRNAs have been found to be

deregulated in CF, such as miR-155, miR-126 and miR-31 [68]. miR-155 is overexpressed in IB3-1 CF cells compared to IB3-1 control cells and in *ex vivo* CF cells (bronchial brushing samples versus normal human bronchial epithelial cells and CF neutrophils CD66+ versus control cells). Moreover, in IB3 cells, miR-155 up-regulation is related to defective CFTR chloride channel activity (following exposure to inh-172). This leads to repression of SHIP1, a well-known effector in the regulation of inflammation, and consequently to activation of the PI3K/AKT pathway that stabilizes IL-8 mRNA through MAPK. Thus, miR-155 up-regulation contributes to the maintenance of a pro-inflammatory phenotype. Furthermore, miR-155-antagomir leads to IL-8 down-regulation in IB3-1CF cells and could represent a candidate treatment for CF. The biogenesis of miR-155 has been in part elucidated and involves the inflammatory RNA binding proteins KSRP and TTP [69]. KSRP promotes miR-155 production, while TTP down-regulates, via miR-1, miR-155 mature expression in CF lung epithelial cells.

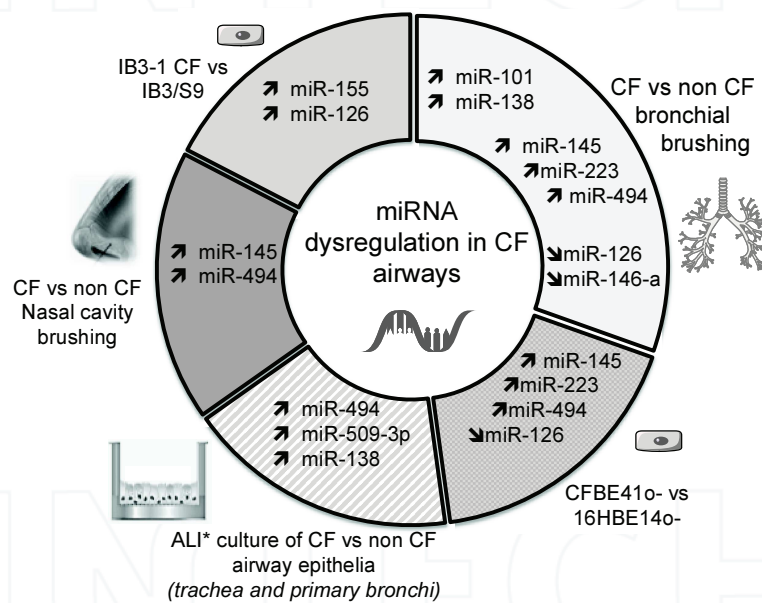


Figure 6. Deregulated miRNAs in different CF models. The schematic lists miRNAs that have been reported to be up-regulated or down-regulated in CF (tissues, cell lines, primary cultures) versus (vs) non-CF samples. *ALI: Air-Liquid Interface.

Conversely, miR-126 down-regulation has an anti-inflammatory role to compensate the immunity response. Oglesby *et al.* [70] reported that miR-126 is consistently decreased in CF compared to non-CF airway epithelial cells and this reduction correlates with up-regulation of TOM1, a negative regulator of TLR2, TLR4, IL-1, IL-1 β and TNF-alpha [71,72]. TOM1, which also negatively regulates NF- κ B, may play an anti-inflammatory role in CF lung. The authors

hypothesized that the observed reduction in miR-126 expression in CF cells may be due to ER stress induced by accumulation of misfolded p.Phe508del CFTR proteins. A complete analysis of the pathways triggered in CF cells seems essential to identify/develop novel treatments for CF.

Another study assessed the miRNA profile, by using Agilent microarray, of CF IB3-1 cells infected or not with *Pseudomonas aeruginosa*, a model mimicking the inflammatory response observed in pulmonary tissues of CF patients [73]. Two miRNAs (miR-93 and miR-494) were found to be strongly deregulated in infected cells. These two miRNAs are predicted to interact with the 3'UTR of *IL-8* mRNA. Down-regulation of miR-93 was confirmed in two other bronchial epithelial cell lines (CF CuFi-1 and non-CF Nuli-1 cells). In non-infected CF cells, miR-93 is strongly expressed and is involved in IL-8 down-regulation combined with low NF- κ B recruitment to the IL-8 promoter. In CF cells infected with *Pseudomonas aeruginosa*, the combined effects of high NF- κ B recruitment to the *IL-8* gene promoter and miR-93 down-regulation lead to high IL-8 expression [73].

Finally, miR-31 is down-regulated in CF bronchial brushing cells compared to non-CF cells [74]. In CF epithelial cells, miR-31 negatively modulates the expression of IRF1, a transcription factor that regulates the level of cathepsin S (CTSS). CTSS is overexpressed in CF airways cell lines, such as bronchial (CFBE), tracheal (CFTE) and CF primary bronchial epithelial cells (CF-PBECs) and has been detected in CF lung secretions. CTSS activates the epithelial sodium channel and cleaves and inactivates antimicrobial proteins such as surfactant A, lactoferrin and members of the β -defensin family, thus contributing to lung inflammation in patients with CF [63-66]. Moreover, in a cohort of paediatric patients with CF, it was found that CTSS level correlates with the decline of lung function. Thus, miR-31 is a potential regulator of CTSS expression via IRF1 in CF epithelial cells [74].

4.2.3. Methods to study deregulated non-coding RNA

Methods to quantify miRNAs in CF and non-CF samples are depicted in Figure 5B. Approaches to identify dysregulated lncRNAs in CF samples are detailed in Figure 7 and databases for lncRNAs are listed in Table 4.

Name	Website	Characteristics	References
LNCipedia	http://www.Lncipedia.org/	Integrated database of human lnc transcripts. Specific annotation of lncRNAs. Algorithms to assess the protein-coding potential of transcripts. LncRNA gene conservation between human, mouse and zebrafish.	[106,107]
lncRNA2Target	http://www.lncrna2target.org/	Curated database with human lncRNA-to-target gene. Target genes based on overexpression and knockdown studies.	[108]

Name	Website	Characteristics	References
lncRNAWiki	http://lncrna.big.ac.cn/index.php/Main_Page	Component of ScienceWiki for community curation of human lncRNAs.	[109]
lncRNAdb	http://www.lncrnadb.org/	Database for functional eukaryotic lncRNAs. Allow blast search of putative lncRNAs. Gene expression data, evolutionary conservation, structural information, genomic context, subcellular localization, functional evidence.	[110,111]
NONCODE	http://www.noncode.org/	Integrated knowledge database dedicated to ncRNAs. NONCODE specific ID for each ncRNA with a conversion tool to RefSeq and Ensembl. Includes all ncRNAs, except transfer RNAs and ribosomal RNAs, ncRNA sequences and relative information (expression, cellular location, chromosomal information...). More than 80% of entries are based on literature data.	[112,113]
NRED : ncRNA expression database	http://nred.matticklab.com/cgi-bin/ncrnadb.pl	Gene expression repository for human and mouse lncRNAs. Includes both microarrays and in situ hybridization data. Includes evolutionary conservation, secondary structure, genomic context.	[114]
GENCODE	http://www.genecodegenes.org/	Human lncRNAs catalog from manually annotated genes Data available via the UCSC Genome Browser	[119]
Human Body Map lincRNAs	http://www.broadinstitute.org/genome_bio/human_lincrnas/	Human reference catalog for lincRNAs Expression data from RNAseq across 24 tissues and cell types. lincRNA features (sequence, structure, transcriptional and orthology features).	[115]
lRNAdb	http://www.ncrna.org/frnadb	Database containing a large collection on non-coding transcripts including annotated and non-annotated sequences from the H-inv database, NONCODE and lRNAdb databases.	[116]
NPInter	http://www.bioinfo.org/npinter/index.php	Database integrating the diverse body of experimental knowledge on functional interactions between ncRNAs (except tRNAs and rRNAs) and protein-related biomacromolecules such as proteins, mRNA of genomic RNAs. Functional interactions (both physical interactions and other forms of interactions) eliciting a cellular reaction.	[117]

Name	Website	Characteristics	References
InCeDB	http://gyanxet-beta.com/Incedb/	Database of lncRNAs acting as competing endogenous RNAs. Putative interactions between lncRNAs and mRNA targets using algorithms and <i>in silico</i> tools such as StarBase.	[118]
lncRbase	http://bicresources.jcbose.ac.in/zhumur/lncrbase/	Comprehensive database of human and mouse lncRNAs. Contains genomic location, overlapping small ncRNAs, associated repeat elements and imprinted genes and lncRNA promoter information.	[119]

Table 4. Free databases for lncRNAs

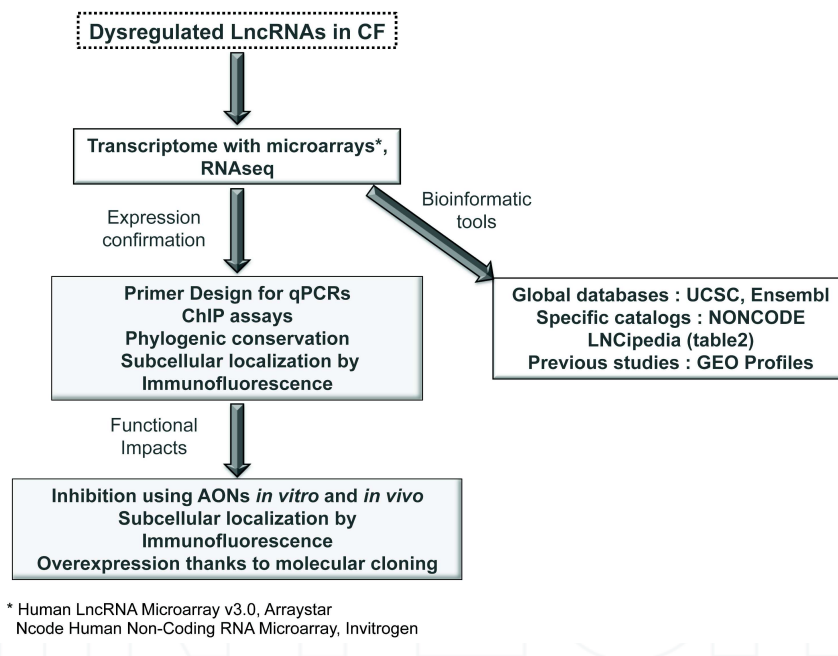


Figure 7. Strategies to study lncRNAs in CF and non-CF samples. Few techniques allow the quantitative analysis of lncRNAs in biological samples. RNAseq: global sequence screening is currently an easy option thanks to NGS and small RNA sequencing. This method allows detecting and quantitating in a biological sample all non-coding transcripts. However, as lncRNAs are very weakly expressed, this strategy might not be fully appropriate. To obtain a significant profile of ncRNAs, more than 180 million reads are required, whereas for protein-coding transcripts, less than 30 million are needed. Therefore, microarray analysis remains a powerful tool for global profiling of lncRNAs. In total, more than 30,586 lncRNAs have been analyzed based on the last lncRNA databases. AONs: antisense oligonucleotides.

4.3. Impact of mutations in lncRNA or miRNA genes

To date, no ncRNA mutation has been described in CF. However, alterations in RNA sequence and/or structure can affect the synthesis, maturation and turnover of ncRNAs. Changes in RNA molecules can be introduced in different ways. For instance, SNPs may affect miRNA biogenesis. miRNA tailing can modify pre-miRNAs and mature miRNAs. RNA editing can modify nucleotide sequences of RNA transcripts. NGS technologies, including exome sequencing and complete re-sequencing of the *CFTR* gene, could reveal mutations in lncRNA sequences that may affect CF severity and outcome.

5. Targeting miRNA as new putative therapeutic tool

5.1. Could miRNAs help in improving CF treatment?

A recent work demonstrated that miR-138 mimics might restore CFTR-Phe508del expression and functional chloride transport. However, the authors stressed that miR-138 mimics may also have undesired effects, because miR-138 targets SIN3A, a highly conserved transcriptional repressor that regulates many genes [67]. Another anti-miRNA agent has been exploited as inhibitor of miR-509-3p, which is involved in the regulation of the *CFTR* gene. Recently, we reported that miRNA function can be blocked by targeting the *CFTR* gene with blockers. We designed blockers to prevent the binding of several miRNAs specifically to the 3'UTR-*CFTR* and tested them in well-differentiated primary human nasal epithelial cells from healthy individuals and patients with CF carrying the p.Phe508del *CFTR* mutation. These molecules rescued CFTR chloride channel activity by increasing *CFTR* mRNA and protein levels. This is in agreement with previous studies showing that complementation of just 6–10% of *CFTR* transcripts leads to the production of enough CFTR to maintain normal chloride transport in epithelia [75]. These data are supported by findings that the presence of a naturally occurring sequence variation in the *CFTR* promoter, in cis of a severe mutation, increases transcription. This allows the production of enough CFTR protein to reach the apical membrane cells and partially restore CFTR channel function, thus leading to a moderate CF phenotype despite the presence of a severe disease-causing mutation [76]. Similarly, stabilization of p.Phe508del CFTR protein has been associated with increased p.Phe508del CFTR channel activity [77].

5.2. Assays and molecules

As depicted in Figure 5Ad, inhibitors or target-site blocker oligonucleotides have been previously used to restore CFTR expression. Tests have been performed by incorporating inhibitors that induce degradation of the targeted endogenous miRNA or with oligonucleotides that block miRNA binding to the 3'UTR of *CFTR* in cell lines, primary cultures and reconstituted epithelium

6. Conclusion and remarks

The identification of *cis*- and *trans*-regulators and pathways involved in *CFTR* gene expression is essential for developing new CF targeted therapies. Over the past four decades, therapies for CF have focused entirely on symptoms to improve patients' quality of life. The first treatment (VX-770) targeted the basic defect in p.Gly551Asp-*CFTR* (1.6% of patients with CF worldwide) [78]. The new molecule VX-809 has been evaluated in patients carrying the p.Phe508del *CFTR* mutation; however, on its own it does not have clear effects [79] and clinical trials testing the combination of different molecules are in progress. The mechanisms responsible for the phenotype severity are not well understood yet. Mutational heterogeneity and complex alleles influence CF severity. Moreover, the role of few modifier genes has been established [80]. ncRNAs could also contribute to CF progression and severity and their dysregulation in CF opens new perspectives for patient follow-up and treatment.

Author details

Jessica Varilh¹, Jennifer Bonini² and Magali Taulan-Cadars^{2*}

*Address all correspondence to: magali.taulan@inserm.fr

1 Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Montpellier, France

2 Laboratoire de Génétique de Maladies Rares, Université Montpellier, UFR de Médecine, Montpellier, France

References

- [1] McCarthy VA, Harris A. The *CFTR* gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40(1): 1-8.
- [2] Viart V, Varilh J, Lopez E, René C, Claustres M, et al. Phosphorylated C/EBP β influences a complex network involving YY1 and USF2 in lung epithelial cells. *PLoS One.* 2013;8(4): e60211.
- [3] Viart V, Bergougnoux A, Bonini J, Varilh J, Chiron R, et al. Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult *CFTR* expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2015;45(1): 116-28.
- [4] Bartoszewski, R, Rab A, Twitty G, Stevenson L, Fortenberry J, et al. The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response. *J Biol Chem.* 2008;283: 12154-65.

- [5] Li, S, Aufiero B, Schiltz RL, Walsh MJ. Regulation of the homeodomain CCAAT displacement/cut protein function by histone acetyltransferases p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor and CBP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97: 7166-71.
- [6] Paul T, Li S, Khurana S, Leleiko NS, Walsh MJ. The epigenetic signature of CFTR expression is co-ordinated via chromatin acetylation through a complex intronic element. *Biochem J*. 2007;408: 317-26.
- [7] Bergougnoux A, Rivals I, Liquori A, Raynal C, Varilh J, et al. A balance between activating and repressive histone modifications regulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in vivo. *Epigenetics*. 2014;9(7): 1007-17.
- [8] Davies WL, Vandenberg Ji, Sayeed Ra, Trezise Ae. Cardiac expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator involves novel exon 1 usage to produce a unique amino-terminal protein. *J Biol Chem*. 2004;279(16): 15877-87.
- [9] Baudouin-Legros M, Hinzpeter A, Jaulmes A, Brouillard F, Costes B, Fanen P, Edelman A. Cell-specific posttranscriptional regulation of CFTR gene expression via influence of MAPK cascades on 3'UTR part of transcripts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Nov;289(5): C1240-50. Epub 2005 Jun 8. PMID:15944206
- [10] Gillen AE, Gosalia N, Leir SH, Harris A. MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochem J*. 2011;438: 25-32.
- [11] Megiorni F, Cialfi S, Dominici C, Quattrucci S, Pizzuti A. Synergistic Post-Transcriptional Regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 Specific Binding. *PLoS One*. 2011;6: e26601.
- [12] Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem*. 2009;55(4): 623-31.
- [13] Twayana S, Legnini I, Cesana M, Cacchiarelli D, Morlando M, et al. Biogenesis and function of non-coding RNAs in muscle differentiation and in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(4): 844-9.
- [14] Moffatt MF. Genes in asthma: new genes and new ways. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008;8(5): 411-17.
- [15] Nana-Sinkam SP, Karsies T, Riscili B, Ezzie M, Piper M. Lung microRNA: from development to disease. *Expert Rev Respir Med*. 2009;3(4): 373-85.
- [16] Mestdagh P, Vandesompele J, Brusselle G, Vermaelen K. Non-coding RNAs and respiratory disease. *Thorax*. 2014. pii: thoraxjnl-2014-206404.
- [17] Booton R, Lindsay MA. Emerging role of MicroRNAs and long noncoding RNAs in respiratory disease. *Chest*. 2014;146(1): 193-204.
- [18] Morris KV, Mattick JS. The rise of regulatory RNA. *Nat Rev Genet*. 2014;15(6): 423-37.

- [19] Derrien T, Guigo R, Johnson R. The long non-coding RNAs : a new player in the « dark matter ». *Front Genet.* 2012;2:107204.
- [20] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementary to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5): 843-54.
- [21] Hu W, Alvarez-Dominguez JR, Lodish HF. Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. *EMBO Rep.* 2012;13(11): 971-83.
- [22] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet.* 2014;15(1): 7-21.
- [23] Michalik KM, You X, Manavski Y, Doddaballapur A, Zörnig M, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res.* 2014;114(9): 1389-97.
- [24] Santosh B, Varshney A, Yadava PK. Non-coding RNAs: biological functions and applications. *Cell Biochem Funct.* 2015;33(1): 14-22.
- [25] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution and expression. *Genome Res.* 2012;22(9): 1775-89.
- [26] Bonasio R, Shiekhattar R. Regulation of transcription by long noncoding RNAs. *Annu Rev Genet.* 2014;48: 433-55.
- [27] Sigova AA, Mullen AC, Molinie B, Gupta S, Orlando DA, et al. Divergent transcription of long noncoding RNA/mRNA gene pairs in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110: 2876–81.
- [28] Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature.* 2009;458: 223–27.
- [29] Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell.* 2011;147: 1537–50.
- [30] Van Bakel H, Nislow C, Blencowe BJ, Hughes TR. Most “dark matter” transcripts are associated with known genes. *PLOS Biol.* 2010; 8:e1000371.
- [31] Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol.* 1996;132: 259–75.
- [32] Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012; 89: 101–8.

- [33] Cho SF, Chang YC, Chang CS, Lin SF, Liu YC, et al. MALAT1 long non-coding RNA is overexpressed in multiple myeloma and may serve as a marker to predict disease progression. *BMC Cancer*. 2014;14: 809.
- [34] Sun T, Ye H, Wu CL, Lee GS, Kantoff PW. Emerging players in prostate cancer: long non-coding RNAs. *Am J Clin Exp Urol*. 2014;2(4): 294-9.
- [35] Li J, Xuan Z, Liu C. Long non-coding RNAs and complex human diseases. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9): 18790-808.
- [36] Maass PG, Luft FC, Bähring S. Long non-coding RNA in health and disease. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(4): 337-46.
- [37] Vencken SF, Greene CM, McKiernan PJ. Non-coding RNA as lung disease biomarkers. *Thorax*. 2014. pii: thoraxjnl-2014-206193.
- [38] Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21(17): 4663-70.
- [39] Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* 16, 495–505 (2010)
- [40] Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*. 22, 3172–83 (2008)
- [41] Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12): 1097-101.
- [42] Kim, VN, Han J and Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2009;10: 126-39.
- [43] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Rev Genet*. 2010;11: 597-610.
- [44] Davis-Dusenbery BN, Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem*. 2010;148: 381-92.
- [45] Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 2007;26(3):775-83.
- [46] Auyeung VC, Ulitsky I, McGeary SE, Bartel DP. Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell*. 2013;152: 844-58.
- [47] Guil S, Caceres JF. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nature Struct Mol Biol*. 2007;14: 591–96.
- [48] Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, Haase AD, Filipowicz W, et al. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature*. 2009;459: 1010-14.

- [49] Michlewski G, Guil S, Semple CA, Caceres JF. Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell*. 2008;32: 383-93.
- [50] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2): 215-33.
- [51] Salmanidis M, Pillman K, Goodall G, Bracken C. Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;54: 304-11.
- [52] Chou JL, Rozmahel R, Tsui LC, et al. Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem*. 1991;266: 24471-76.
- [53] Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Dalemans W, Pavirani A, et al. The cystic fibrosis gene has a "housekeeping"-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin. *J Biol Chem*. 1991; 266: 9140-44.
- [54] Koh J, Sferra TJ, Collins FS. Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator promoter region. Chromatin context and tissue-specificity. *J Biol Chem*. 1993; 268: 15912-21.
- [55] White NL, Higgins CF, Trezise AE. Tissue-specific in vivo transcription start sites of the human and murine cystic fibrosis genes. *Hum Mol Genet*. 1998;7: 363-9.
- [56] Harris A, Chalkley G, Goodman S, Coleman L. Expression of the cystic fibrosis gene in human development. *Development*. 1991;113: 305-10.
- [57] McCray PB Jr, Reenstra WW, Louie E, et al. Expression of CFTR and presence of cAMP-mediated fluid secretion in human fetal lung. *Am J Physiol*. 1992;262: L472-L481.
- [58] Trezise AE, Chambers JA, Wardle CJ, Gould S, Harris A. Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Hum Mol Genet*. 1993;2: 213-18.
- [59] Tizzano EF, O'Brodovich H, Chitayat D, Bènichou JC, Buchwald M. Regional expression of CFTR in developing human respiratory tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;10: 355-62.
- [60] Marcoelles P, Montier T, Gillet D, Lagarde N, Ferec C. Evolution of CFTR protein distribution in lung tissue from normal and CF human fetuses. *Pediatr Pulmonol*. 2007; 42: 1032-40.
- [61] Amato F, Seia M, Giordano S, Elce A, Zarrilli F, et al. Gene mutation in microRNA target sites of CFTR gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis? *PLoS One*. 2013;8(3): e60448.
- [62] Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(6 Pt 1): 111-18.

- [63] Birrer P, McElvaney NG, R deberg A, Sommer CW, Liechti-Gallati S, et al. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(1): 207-13.
- [64] McKiernan PJ, Molloy K, Cryan SA, McElvaney NG, Greene CM. Long noncoding RNA are aberrantly expressed in vivo in the cystic fibrosis bronchial epithelium. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;52: 184-91.
- [65] Oglesby IK, Chotirmall SH, McElvaney NG, Greene CM. Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by microRNA-145, -223, and -494 is altered in $\Delta F508$ cystic fibrosis airway epithelium. *J Immunol.* 2013;190(7): 3354-62.
- [66] Xu W, Hui C, Yu SS, Jing C, Chan HC. MicroRNAs and cystic fibrosis-an epigenetic perspective. *Cell Biol Int.* 2011;35(5): 463-6.
- [67] Ramachandran S, Karp PH, Osterhaus SR, Jiang P, Wohlford-Lenane C, et al. Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013; 49(4): 544-51.
- [68] Bhattacharyya S, Balakathiresan NS, Dalgard C, Gutti U, Armistead D, et al. Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8. *J Biol Chem.* 2011;286(13): 11604-15.
- [69] Bhattacharyya S, Kumar P, Tsuchiya M, Bhattacharyya A, Biswas R. Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;433(4): 484-8.
- [70] Oglesby IK, Bray IM, Chotirmall SH, Stallings RL, O'Neill SJ, et al. miR-126 is down-regulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol.* 2010;184(4): 1702-9.
- [71] Katoh Y, Shiba Y, Mitsuhashi H, Yanagida Y, Takatsu H, et al. Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *J Biol Chem.* 2004;279(23): 24435-43.
- [72] Yamakami M, Yokosawa H. Tom1 (target of Myb 1) is a novel negative regulator of interleukin-1- and tumor necrosis factor-induced signaling pathways. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(4): 564-6.
- [73] Fabbri E, Borgatti M, Montagner G, Bianchi N, Finotti A, et al. Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of proinflammatory responses. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(6): 1144-55.
- [74] Weldon S, McNally P, McAuley DF, Oglesby IK, Wohlford-Lenane CL, et al. Taggart CC. miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(2): 165-74.

- [75] Broackes-Carter FC, Mouchel N, Gill D, Hyde S, Bassett J, et al. Temporal regulation of CFTR expression during ovine lung development: implications for CF gene therapy. *Hum Mol Genet.* 2002;11(2): 125-31.
- [76] Romey MC, Pallares-Ruiz N, Mange A, Mettling C, Peytavi R, et al. A naturally occurring sequence variation that creates a YY1 element is associated with increased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression. *J Biol Chem.* 2000;275(5): 3561-7.
- [77] Hutt DM, Herman D, Rodrigues AP, Noel S, Pilewski JM, et al. Reduced histone deacetylase 7 activity restores function to misfolded CFTR in cystic fibrosis. *Nat Chem Biol.* 2010;6(1): 25-33.
- [78] Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, et al. VX08-770-102 Study Group. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med.* 2011;365(18): 1663-72.
- [79] Clancy JP, Jain M. Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(7): 593-7.
- [80] Knowles MR, Drumm M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(12).
- [81] Sharma A, Kumar M, Aich J, Hariharan M, Brahmachari SK, et al. Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(14):5761-6.
- [82] Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol.* 2009;182(8): 4994-5002.
- [83] Chiba Y, Tanabe M, Goto K, Sakai H, Misawa M. Down-regulation of miR-133a contributes to up-regulation of RhoA in bronchial smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(8): 713-9.
- [84] Mohamed JS, Lopez MA, Boriak AM. Mechanical stretch up-regulates microRNA-26a and induces human airway smooth muscle hypertrophy by suppressing glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem.* 2010;285(38): 29336-47.
- [85] Polikepahad S, Knight JM, Naghavi AO, Oplt T, Creighton CJ, et al. Proinflammatory role for let-7 microRNAs in experimental asthma. *J Biol Chem.* 2010;285(39): 30139-49.
- [86] Christenson, S., J. Campbell, J. Zeskind, J. McDonough, P. Sanchez, et al. MicroRNA as regulators of gene expression changes that occur with the progression of emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181: pp. A2024.
- [87] Sato T, Liu X, Nelson A, Nakanishi M, Kanaji N, et al. Reduced miR-146a increases prostaglandin E in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(8): 1020-9.

- [88] Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*. 2010;207(8): 1589-97.
- [89] Pottier N, Maurin T, Chevalier B, Puisségur MP, Lebrigand K, et al. Identification of keratinocyte growth factor as a target of microRNA-155 in lung fibroblasts: implication in epithelial-mesenchymal interactions. *PLoS One*. 2009;4(8): e6718.
- [90] Pandit KV, Corcoran D, Yousef H, Yarlagadda M, Tzouvelekis A, et al. Inhibition and role of let-7d in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(2): 220-9.
- [91] Friedman, RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19: 92-105.
- [92] John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, et al. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2004;2: e363.
- [93] Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;7: 495-500.
- [94] Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*. 2004;10: 1507-17.
- [95] Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*. 2007;39: 1278-84.
- [96] Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan 28;43 (Database issue):D146-52.
- [97] Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos GL, Reczko M, Dalamagas T, et al. Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics*. 2009;10: 295.
- [98] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42 (Database issue):D68-73.
- [99] Hsu JB, Chiu CM, Hsu SD, Huang WY, Chien CH, et al. miRTar: an integrated system for identifying miRNA-target interactions in human. *BMC Bioinformatics*. 2011;12: 300.
- [100] Hsu SD, Chu CH, Tsou AP, Chen SJ, Chen HC et al. miRNAMap 2.0: genomic maps of microRNAs in metazoan genomes. *Nucleic Acids Res*. 2008;36: D165-169.
- [101] Le Brigand K, Robbe-Sermesant K., Mari B, Barbry P. MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics*. 2010;26: 3131-32.
- [102] Le Behec A, Portales-Casamar E, Vetter G, Moes M, Zindy PJ et al. MIR@NT@N: a framework integrating transcription factors, microRNAs and their targets to identify sub-network motifs in a meta-regulation network model. *BMC Bioinformatics*. 2011;12: 67.

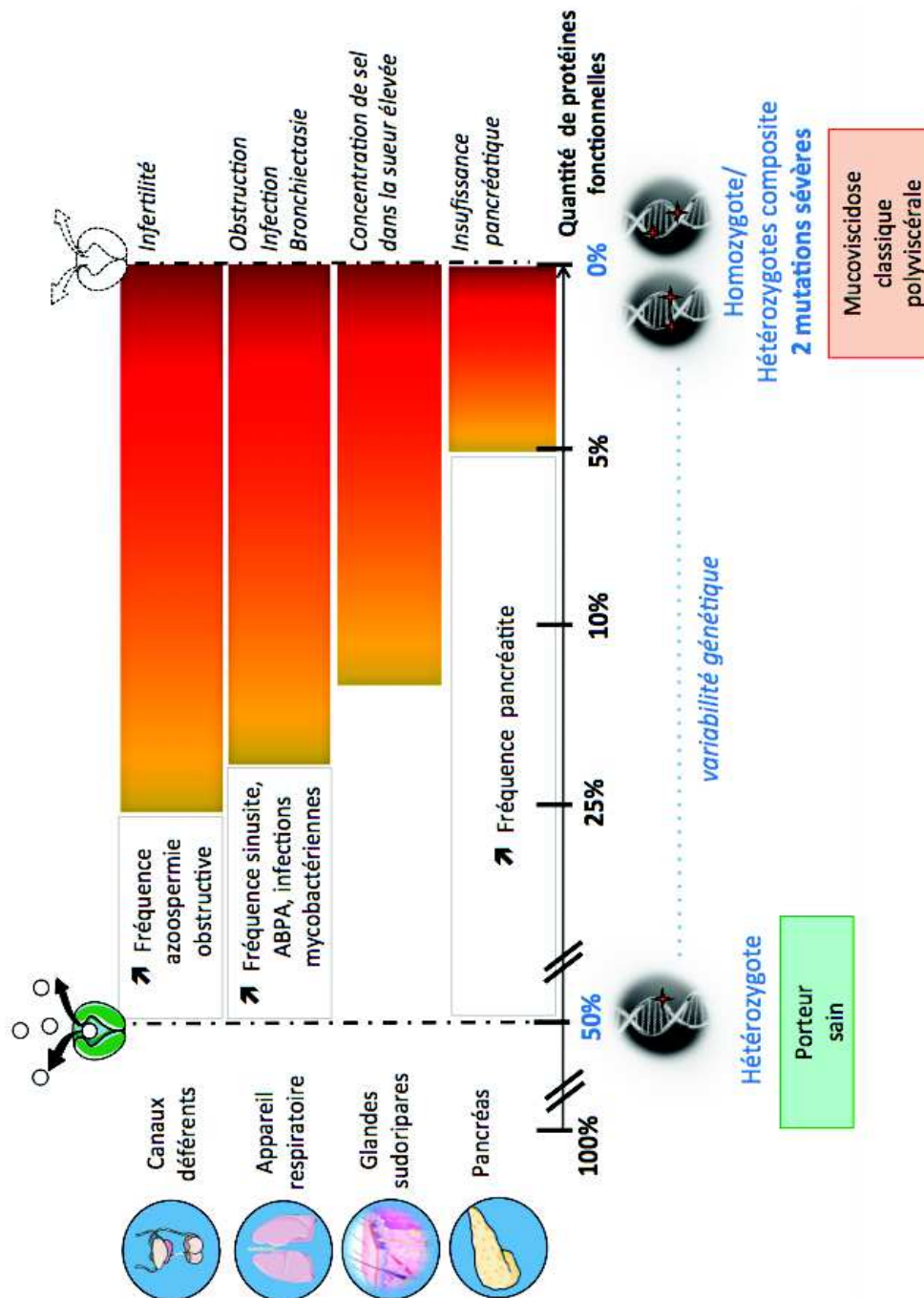
- [103] Nam JW, Kim J, Kim SK, Zhang BT. ProMiR II: a web server for the probabilistic prediction of clustered, nonclustered, conserved and nonconserved microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2006;34: W455-458.
- [104] Alexiou P, Vergoulis T, Gleditzsch M, Prekas G, Dalamagas T et al. miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation. *Nucleic Acids Res.* 2010;38 (Database issue): D137-41.
- [105] Maselli V, Di Bernardo D, Banfi S. CoGemiR: a comparative genomics microRNA database. *BMC Genomics.* 2008;9: 457.
- [106] Volders PJ, Helsens K, Wang X, Menten B, Martens L et al. LNCipedia: a database for annotated human lncRNA transcript sequences and structures. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue): D246-51.
- [107] Volders PJ, Verheggen K, Menschaert G, Vandepoele K, Martens L2 et al. An update on LNCipedia: a database for annotated human lncRNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue): D174-80.
- [108] Jiang Q, Wang J, Wu X, Ma R, Zhang T et al. LncRNA2Target: a database for differentially expressed genes after lncRNA knockdown or overexpression. *Nucleic Acids Res.* 2015;43 (Database issue): D193-6.
- [109] Ma L, Li A, Zou D, Xu X, Xia L et al. LncRNAWiki: harnessing community knowledge in collaborative curation of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2015;43 (Database issue): D187-92.
- [110] Amaral PP, Clark MB, Gascoigne DK, Dinger ME, Mattick JS. lncRNADB: a reference database for long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2011;39 (Database issue): D146-51.
- [111] Quek XC, Thomson DW, Maag JL, Bartonicek N, Signal B et al. lncRNADB v2.0: expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2015;43 (Database issue):D168-73.
- [112] Xie C, Yuan J, Li H, Li M, Zhao G et al. NONCODEv4: exploring the world of long non-coding RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue): D98-103.
- [113] Liu C, Bai B, Skogerbø G, Cai L, Deng W et al. NONCODE: an integrated knowledge database of non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2005;33 (Database issue): D112-5.
- [114] Dinger ME, Pang KC, Mercer TR, Crowe ML, Grimmond SM et al. NRED: a database of long noncoding RNA expression. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue): D122-6.
- [115] Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 2011;25(18):1915-27.

- [116] Kin T, Yamada K, Terai G, Okida H, Yoshinari Y et al. fRNAdb: a platform for mining/annotating functional RNA candidates from non-coding RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2007;35 (Database issue):D145-8.
- [117] Yuan J, Wu W, Xie C, Zhao G, Zhao Y et al. NPInter v2.0: an updated database of ncRNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue): D104-8.
- [118] Das S, Ghosal S, Sen R, Chakrabarti J. InCeDB: database of human long noncoding RNA acting as competing endogenous RNA. *PLoS One.* 2014;9(6): e98965.
- [119] Chakraborty S, Deb A, Maji RK, Saha S, Ghosh Z. LncRBase: an enriched resource for lncRNA information. *PLoS One.* 2014;9(9): e108010.

INTECH

INTECH

6.2. Protéines fonctionnelles et phénotype



Corrélation génotype/phénotype en fonction des différents organes.

(Adapté de Sosnay *et al.* 2011)

APBA = Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique ; Variabilité génétique : des individus porteurs de deux mutations modérées ou d'une mutation modérée et d'une mutation sévère présentent un phénotype moins sévère que les patients atteints de mucoviscidose classique (2 mutations sévères). La pénétrance est relative pour tous ces organes, excepté pour l'appareil reproducteur masculin qui est plus sensible à une diminution de l'activité protéique et dont la pénétrance est presque totale. Les auteurs estiment que 5% de protéines fonctionnelles permet d'avoir un phénotype atténué.

6.3. miARNs agissant sur l'expression du gène *CFTR*

↗ = Augmentation

↘ = Diminution

Si présence de ▲ = activité du canal (pour la colonne protéine)

miARNs	Modèle cellulaire	Activité luciférase 3'UTR <i>CFTR</i>		Taux endogène ARNm <i>CFTR</i>		Taux endogène protéine <i>CFTR</i>	
		Effet avec précurseur ou mimic	Effet avec inhibiteur	Effet avec précurseur ou mimic	Effet avec inhibiteur	Effet avec précurseur ou mimic	Effet avec inhibiteur
miR-1	CFPAC6.0 Kumar <i>et al.</i> 2015			↗		↗	
miR-16	CFPAC6.0 Kumar <i>et al.</i> 2015			↗		↗	
	Cultures primaires bronchiques CF en ALI Kumar <i>et al.</i> 2015					↗▲	
miR-101	HEK293 Hassan <i>et al.</i> 2012, Megiorni <i>et al.</i> 2011	↘					
	16HBE41o- Megiorni <i>et al.</i> 2011					↘	
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011			Pas d'effet		Pas d'effet	
miR-138	Calu-3 Ramachandran <i>et al.</i> 2012			↗	↘	↗	↘
						↗▲	↘▲

miR-138	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires Ramachandran <i>et al.</i> 2012			↗	↘	↗▲ ↗▲	↘ ↘▲
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires homozygotes p.Phe508del Ramachandran <i>et al.</i> 2012			↗		↗ ↗▲	
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires hétérozygotes p.Phe508del Ramachandran <i>et al.</i> 2012					↗▲	
	Hela Ramachandran <i>et al.</i> 2012			↗		↗ ↗▲	
	HEK293 Ramachandran <i>et al.</i> 2012			↗		↗	
	CFBE41o- Ramachandran <i>et al.</i> 2012			↗	↘	↗ ↗▲	↘ ↘▲
	HEK293 Hassan <i>et al.</i> 2012	↘					
miR-144	16HBE41o- Hassan <i>et al.</i> 2012					↘	
	HEK293 Oglesby <i>et al.</i> 2013	↘					
miR-145	16HBE41o- Oglesby <i>et al.</i> 2013			↘		↘	
	CFBE41o- Oglesby <i>et al.</i> 2013				↗		
	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘					

miR-145	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘		↘		↘	
miR-223	HEK293 Oglesby <i>et al.</i> 2013	↘					
	16HBE41o- Oglesby <i>et al.</i> 2013			↘		↘	
	CFBE41o- Oglesby <i>et al.</i> 2013				↗		
miR-302-a	CFPAC6.0 Kumar <i>et al.</i> 2015			↗		↗	
	Cultures primaires bronchiques CF en ALI Kumar <i>et al.</i> 2015					↗▲	
miR-331-3p	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘		↘		↘	
miR-376b	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	Pas d'effet					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘		↘			
miR-377	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	Pas d'effet					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	Pas d'effet		↘			
miR-384	16HBE41o- Gillen <i>et al.</i> 2011	↘					
	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘		↘		↘	

miR-433	PANC-1 <i>Amato et al. 2013</i>	↘	↗			↘	
miR-494	HEK293 <i>Oglesby et al. 2013,</i> <i>Megiorni et al. 2011,</i> <i>Ramachandran et al. 2013</i>	↘					
	16HBE41o- <i>Gillen et al. 2011</i> (luciférase), <i>Oglesby et al. 2013</i> (ARNm et protéine)	↘		↘		↘	
	CFBE41o- <i>Oglesby et al. 2013,</i>				↗		
	PANC-1 <i>Gillen et al. 2011</i>	↘					
	Caco-2 <i>Gillen et al. 2011</i>	↘		↘		↘	
	Calu-3 <i>Ramachandran et al. 2013</i>			↘	↗	↘ ↘▲	↗ ↗▲
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires <i>Ramachandran et al. 2013</i>			↘	↗	↘ ↘▲	↗ ↗▲
miR-509-3p	PANC-1 <i>Amato et al. 2013</i>	↘	↗			↘	
	HEK293 <i>Amato et al. 2013</i> (miARN et inhibiteur), <i>Ramachandran et al. 2013</i> (miARN)	↘ ↘	↗				
	Calu-3 <i>Ramachandran et al. 2013</i>			↘	↗	↘ ↘▲	↗ ↗▲
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires <i>Ramachandran et al. 2013</i>			↘	↗	↘ ↘▲	↗ ↗▲

miR-600	16HBE410- Gillen <i>et al.</i> 2011	↘					
	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	↗					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	Pas d'effet		↘			
miR-607	16HBE410- Gillen <i>et al.</i> 2011	↘					
	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	Pas d'effet					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	Pas d'effet		↘			
miR-939	16HBE410- Gillen <i>et al.</i> 2011	Pas d'effet					
	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	↗					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	↗		↘			
miR-1246	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘		↘			
miR-1290	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	Pas d'effet		↘		↘	
miR-1827	PANC-1 Gillen <i>et al.</i> 2011	↘					
	Caco-2 Gillen <i>et al.</i> 2011	Pas d'effet		↘			

6.4. Les miARNs dérégulés chez les individus CF

miARNs	Modèle cellulaire	Technique de quantification	Dérégulation	
			↗ CF	↘ CF
hsa-let-7b	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-let-7c	IB3-1 CF vs IB3-1/S9 Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array) - RT-qPCR spécifique	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-7	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-10a	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-15a	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
mmu-miR-15a	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-15a*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
mmu-miR-16	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array) - RT-qPCR spécifique	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-16-1*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-17	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
	CFTE29o- vs 9HTEo-	- RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2015a	
	CFBE41o- vs 16HBE140-	- RT-qPCR spécifique		Oglesby <i>et al.</i> 2010
mmu-miR-17	Souris β ENaC-Tg vs WT	- RT-qPCR spécifique		Oglesby <i>et al.</i> 2015a
	Souris Cfr -/- vs WT	- RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2015a	

mmu-miR-19a	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
mmu-miR-19b	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array) - RT-qPCR spécifique	Bazett <i>et al.</i> 2011	
mmu-miR-20a	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-20b	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-21	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
mmu-miR-21	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
mmu-miR-22	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-23b	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
mmu-miR-25	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-26a-1*	Culture ALI issues de trachée ou de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-26b	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-27a*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-27b	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
mmu-miR-28	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-29c	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-29c*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010

hsa-miR-30a	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-30a*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-30d	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-30e*	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-31	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR spécifique		Weldon <i>et al.</i> 2014
	Cultures bronchiques ALI CF vs non CF	- RT-qPCR spécifique		Weldon <i>et al.</i> 2014
	CFBE41o- vs 16HBE14o-	- RT-qPCR spécifique		Weldon <i>et al.</i> 2014
	CFTE29o- vs 9HTEo-	- RT-qPCR spécifique		Weldon <i>et al.</i> 2014
mmu-miR-32	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
mmu-miR-33	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-34a	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-34a*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
mmu-miR-34b- 3p	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-93*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-95	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010

hsa-miR-99a	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-99b*	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-100	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-101	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
mmu-miR-101b	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-106	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
mmu-miR-106a	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
mmu-miR-106b	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array) - RT-qPCR spécifique	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-125a-5p	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-125b	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-126	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - RT-qPCR spécifique		Oglesby <i>et al.</i> 2010
	CFBE41o- vs 16HBE140-	- RT-qPCR spécifique		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-126*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010

hsa-miR-127-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-130a	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-135a*	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-135b	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-138	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-140-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-140-5p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-141	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-142-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-142-5p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-143	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-144*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-145	CFBE41o- vs 16HBE140-	- RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2013 Oglesby <i>et al.</i> 2015b	
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2010 Oglesby <i>et al.</i> 2013 Oglesby <i>et al.</i> 2015b	
	Brossages nasaux CF vs non CF	- RT-qPCR spécifique	Megiorni <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-146a	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-150	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010

hsa-miR-151-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
mmu-miR-151-5p	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-152	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-155	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
		- Puce d'expression (array)		
	- RT-qPCR spécifique	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2013		
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR spécifique	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
	Neutrophiles CD66+ CF vs non CF	- RT-qPCR spécifique	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-188-5p	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-190	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-190b	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
mmu-miR-191	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-192	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011
		- Puce d'expression (array)		
mmu-miR-193	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
		- RT-qPCR spécifique		
hsa-miR-193a-5p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-193b	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-194	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011
		- Puce d'expression (array)		

hsa-miR-199a-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-200a*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-200b	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-200b*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-200c	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-203	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-205	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
mmu-miR-207	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-212	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-221	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2015b	
	CFBE41o- vs 16HBE140-	- RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2015b	
hsa-miR-222	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-223	CFBE41o- vs 16HBE140-	- RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2013	
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques -RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2010 Oglesby <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-223*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-301	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
mmu-miR-301a	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
mmu-miR-290-5p	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	

hsa-miR-320	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-324-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-328	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-340	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-339-3p	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-340*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-361-5p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-362-5p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-365	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
mmu-miR-365	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array) - RT-qPCR spécifique	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-374a	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-374b	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-378	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
mmu-miR-381	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-423-3p	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-424	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-425*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	

hsa-miR-429	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-450a	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-451	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-452	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-483-5p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-484	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-491-5p	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-494	CFBE41o- vs 16HBE140-	- RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2013	
	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - RT-qPCR spécifique	Oglesby <i>et al.</i> 2010 Oglesby <i>et al.</i> 2013 Oglesby <i>et al.</i> 2015b	
	Brossages nasaux CF vs non CF	- RT-qPCR spécifique	Megiorni <i>et al.</i> 2013	
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - RT-qPCR spécifique	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
	Epithélium de trachées et de bronches primaires fraichement dissocié CF vs non CF	- RT-qPCR spécifique	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-502-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-509-3p	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - RT-qPCR spécifique	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
	Epithélium de trachées et de bronches primaires fraichement dissocié CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-526b*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	

hsa-miR-532-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-532-5p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-565	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-574-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-576-5p	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)	Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011	
hsa-miR-597	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-598	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-601	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-610	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-615-3p	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)		Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011
hsa-miR-629*	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-632	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-660	IB3-1 CF vs IB3-1/S9	- RT-qPCR : cartes microfluidiques - Puce d'expression (array)		Bhattacharyya <i>et al.</i> 2011
hsa-miR-661	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-671-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
hsa-miR-708	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
mmu-miR-711	Tissu intestinal de souris CF vs non CF	- Puce d'expression (array)	Bazett <i>et al.</i> 2011	

hsa-miR-768-3p	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-769-5p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques		Oglesby <i>et al.</i> 2010
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-801	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
	Culture ALI issues de trachées et de bronches primaires CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Ramachandran <i>et al.</i> 2013	
hsa-miR-877	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-886-3p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	
hsa-miR-886-5p	Brossages bronchiques CF vs non CF	- RT-qPCR : cartes microfluidiques	Oglesby <i>et al.</i> 2010	

7. RÉFÉRENCES

A

Adam D., Perotin J.M., Lebargy F., *et al.*, 2014. Régénération de l'épithélium des voies aériennes. *Revue des Maladies Respiratoires* 31(4) : 300-311.

Alton E.W., Armstrong D.K., Ashby D., *et al.*, 2015. Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med* 3(9) : 684-691.

Amaral M.D., 2005. Processing of CFTR: traversing the cellular maze--how much CFTR needs to go through to avoid cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol* 39(6) : 479-491.

Amaral M.D., 2015. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med* 277(2) : 155-166.

Amato F., Seia M., Giordano S., 2013. Gene mutation in microRNA target sites of CFTR gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis? *PLoS One* 8(3) : 4-9.

Anderson M.P., Gregory R.J., Thompson S., 1991. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253(5016) : 202-205.

Angulo M., Lecuona E., Sznajder J.I., 2012. Role of MicroRNAs in lung disease. *Arch Bronconeumol* 48(9) : 325-330.

Arechavala-Gomez V., Khoo B., Aartsma-Rus A., 2014. Splicing modulation therapy in the treatment of genetic diseases. *Appl Clin Genet* 4(7) : 245-252.

Armstrong D.K., Cunningham S., Davies J.C., 2014. Gene therapy in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 99(5) : 465-468.

Audrézet M.P., Munck A., Scotet V., *et al.*, 2014. Comprehensive CFTR gene analysis of the French cystic fibrosis screened newborn cohort: implications for diagnosis, genetic counseling, and mutation-specific therapy. *Genet Med* 17(2) : 108-116.

Ayala Y.M., Pagani F., Baralle F.E., 2006. TDP43 depletion rescues aberrant CFTR exon 9 skipping. *FEBS Letters* 580(5) : 1339-1344.

B

Baralle D., Baralle M., 2005. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet* 42(10) : 737-748.

Barbosa C., Peixeiro I., Romão L., 2013. Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet* 9(8) : 1-12.

Barreau C., Paillard L., Osborne H.B., 2006. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* 33(22) : 7138-7150.

Barriere H., Lukacs G.L., 2006, *Intracellular Processing of CFTR, Cystic Fibrosis in the 21 st Century*, Chapter 3, page 21-28.

Bartling T.R., Drumm M.L., 2009. Oxidative stress causes IL8 promoter hyperacetylation in cystic fibrosis airway cell models. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40(1) : 58-65.

- Bartoszewski R., Rab A., Jurkuvenaite A., 2008a. Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39(4) : 448-457.
- Bartoszewski R., Rab A., Twitty G., 2008b. The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response. *J Biol Chem* 283(18) : 12154-12165.
- Bartoszewski R.A., Jablonsky M., Bartoszewska S., 2010. A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein. *J Biol Chem* 285(37) : 28741-28748.
- Bassères D.S., Levantini E., Ji H., 2006. Respiratory failure due to differentiation arrest and expansion of alveolar cells following lung-specific loss of the transcription factor C/EBPalpha in mice. *Mol Cell Biol* 26(3) : 1109-1123.
- Baudouin-Legros M., Hinzpeter A., Jaulmes 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-C1250.
- Ben-Chetrit A., Antenos M., Jurisicova A., 2002. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator during early human embryo development. *Mol Hum Reprod* 8(8) : 758-764.
- Berg T., Didon L., Nord M., 2006. Ectopic expression of C/EBPalpha in the lung epithelium disrupts late lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(4) : L683-L693.
- Bergougnoux A., Rivals I., Liquori A., 2014. A balance between activating and repressive histone modifications regulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression in vivo. *Epigenetics* 9(7) : 1007-1017.
- Bhattacharyya S., Balakathiresan N.S., Dalgard C., 2011. Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8. *J Biol Chem* 286(13) : 11604-15.
- Bhattacharyya S., Kumar P., Tsuchiya M., 2013. Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: Antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP. *Biochem Biophys Res Commun* 433(4) : 484-488.
- Bhattacharyya S.N., Habermacher R., Martine U., 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125(6) : 1111-1124.
- Bienvenu T., Lacronique V., Raymondjean M., 1995. Three novel sequence variations in the 5' upstream region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene: two polymorphisms and one putative molecular defect. *Hum Genet* 95(6) : 698-702.
- Blackledge N.P., Carter E.J., Evans J.R., *et al.*, 2007. CTCF mediates insulator function at the CFTR locus. *Biochem J* 408(2) : 267-275.
- Blackledge N.P., Ott C.J., Gillen A.E., *et al.*, 2009. An insulator element 3' to the CFTR gene binds CTCF and reveals an active chromatin hub in primary cells. *Nucleic Acids Res* 37(4) : 1086-1094.

De Boeck K., Wilschanski M., Castellani C., *et al.*, 2006. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 61(7) : 627-635.

Bohinski R.J., Di Lauro R., Whitsett J.A. 1994. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol Cell Biol* 14(9) : 5671-5681.

Borchert G.M., Lanier W., Davidson B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13(12) : 1097-1101.

Borthwick L.A., Botha P., Verdon B., *et al.*, 2011. Is CFTR-delF508 really absent from the apical membrane of the airway epithelium? *PLoS One* 6(8) : e23226.

Boutla A., Delidakis C., Tabler M., 2003. Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes. *Nucleic Acids Res* 31(17) : 4973-4980.

Boyle M.P., De Boeck K., 2013. A new era in the treatment of cystic fibrosis: Correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med* 1(2) : 158-163.

Broackes-Carter F.C., Mouchel N., Gill D., *et al.*, 2002. Temporal regulation of CFTR expression during ovine lung development: implications for CF gene therapy. *Hum Mol Genet* 11(2) : 125-131.

Brouillard F., Bouthier M., Leclerc T., *et al.*, 2001. NF- κ B Mediates Up-regulation of CFTR Gene Expression in Calu-3 Cells by Interleukin-1 β . *J Biol Chem* 276(12) : 9486-9491.

Brown D., Rahman M., Nana-Sinkam S.P., 2014. MicroRNAs in respiratory disease. A clinician's overview. *Annals of the American Thoracic Society* 11(8) : 1277–1285.

Buratti E., Dörk T., Zuccato E., *et al.*, 2001. Nuclear factor TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO Journal* 20(7) : 1774–1784.

Buratti E., Brindisi A., Giombi M., *et al.*, 2005. TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J Biol Chem* 280(45) : 37572-37584.

C

Cafferata E.G., González-Guerrico A.M., Giordano L., *et al.*, 2000. Interleukin-1 β regulates CFTR expression in human intestinal T84 cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1500(2) : 241-248.

Cafferata E.G., Guerrico A.M., Pivetta O.H., *et al.*, 2001. NF- κ B activation is involved in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by interleukin-1 β . *The Journal of biological chemistry* 276(18) : 15441-15444.

Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., *et al.*, 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(24) : 15524-15529.

Cannon C.L., Hogue L.A., Vajravelu R.K., *et al.*, 2009. In Vitro and Murine Efficacy and Toxicity Studies of Nebulized SCC1, a Methylated Caffeine-Silver(I) Complex, for Treatment of Pulmonary Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(8) : 3285–3293

Cantin A.M., Bilodeau G., Ouellet C., *et al.*, 2006a. Oxidant stress suppresses CFTR expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(1) : C262-C270.

Cantin A.M., Hanrahan J.W., Bilodeau G., *et al.*, 2006b. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function is suppressed in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 173(10) : 1139-1144

Cantin A.M., Hartl D., Konstan M.W., *et al.*, 2015. Inflammation in cystic fibrosis lung disease : Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros* 14(4) : 419-430.

Castellani C., Cuppens H., Macek M., *et al.*, 2008. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 7(3) : 179-196.

Chan H.C., Jiang, X., Ruan Y.C., 2014. Emerging role of cystic fi brosis transmembrane conductance regulator as an epigenetic regulator : linking environmental cues to microRNAs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41(9) : 615–622.

Chen X., Ba Y., Ma L., *et al.*, 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18(10) : 997-1006.

Chen Z., Zeng H., Guo Y., *et al.*, 2010. MiRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc. *J Exp Clin Cancer Res* 29 : 151.

Cheng S.H., Gregory R.J., Marshall J., *et al.*, 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63(4) : 827-834.

Chillón M., Dörk T., Casals T., *et al.*, 1995. A novel donor splice site in intron 11 of the CFTR gene, created by mutation 1811+1.6kbA-->G, produces a new exon: high frequency in Spanish cystic fibrosis chromosomes and association with severe phenotype. *Am J Hum Genet* 56(3) : 623-629.

Cho H.M., Jeon H.S., Lee S.Y., *et al.*, 2011. MicroRNA-101 inhibits lung cancer invasion through the regulation of enhancer of zeste homolog 2. *Exp Ther Med* 2(5) : 963-967.

Cholon D.M., Quinney N.L., Fulcher M.L., *et al.*, 2014. Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of DeltaF508 CFTR in cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 6(246) : 1-31.

Chou J.L., Rozmahel R., Tsui L.C., 1991. Rozmahel, R. & Tsui, L.C., 1991. Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *The Journal of biological chemistry* 266(36) : 24471-24476.

Chu C.S., Trapnell B.C., Murtagh J.J., *et al.*, 1991. Variable deletion of exon 9 coding sequences in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mRNA transcripts in normal bronchial epithelium. *The EMBO journal* 10(6) : 1355–1363.

Chu C.S., Trapnell B.C., Curristin S.M., *et al.*, 1992. Extensive Posttranscriptional Deletion of the Coding Sequences for Part of Nucleotide-binding Fold 1 in Respiratory Epithelial mRNA Transcripts of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Is Not Associated with the Clinical Manifestati. *The Journal of Clinical Investigation* 90(3) : 785-790.

Chu C.S., Trapnell B.C., Curristin S., *et al.*, 1993. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature genetics* 3(2) : 151–156.

Clain J., Fritsch J., Lehmann-Che J., *et al.*, 2001. Two Mild Cystic Fibrosis-associated Mutations Result in Severe Cystic Fibrosis When Combined in Cis and Reveal a Residue Important for Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Processing and Function. *Journal of Biological Chemistry* 276(12) : 9045-9049.

Clancy J.P., Rowe S.M., Accurso F.J., *et al.*, 2012. 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(1) : 12-18.

Claustres M., 2005. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod.Biomed.Online*. 10(1) : 14-41.

Clunes M.T., Boucher R.C., 2008. Front-runners for pharmacotherapeutic correction of the airway ion transport defect in cystic fibrosis. *Current Opinion in Pharmacology* 8(3) : 292–299.

Cohen-Cyberknoh, M., Shoseyov, D. & Kerem, E., 2011. Managing Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(11) :1463–1471.

Coraux C., Hajj R., Lesimple P., *et al.*, 2005. Repair and regeneration of the airway epithelium. *Med Sci* 21(12) : 1063-1069.

Corcos L., Solier S., 2005. Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics. *Med Sci* 21(3) : 253-260.

Corvol H., Flamant C., Vallet C., *et al.*, 2006. Modifier genes and cystic fibrosis. *Archives de Pédiatrie* 13(1) : 57–63.

Crosby J.R., Guha M., Thung D., *et al.*, 2007. Inhaled CD86 antisense oligonucleotide suppresses pulmonary inflammation and airway hyper-responsiveness in allergic mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321(3) : 938–946.

Cutting G.R., 2014. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16(1) : 45-56.

D

Dai W., Li W., Hoque M., *et al.*, 2015. A post-transcriptional mechanism pacing expression of neural genes with precursor cell differentiation status. *Nat Commun* 6 : 7576.

Dalemans W., Barbry P., Champigny G., *et al.*, 1991. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 354(6354) : 526–528.

Dannhoffer L., Blouquit-Laye S., Regnier A., *et al.*, 2009. Functional Properties of Mixed Cystic Fibrosis and Normal Bronchial Epithelial Cell Cultures. *Am J Respir Cell Mol Bio* 40(6) : 717-723.

Davies W.L., Vandenberg J.I., Sayeed R.A., *et al.*, 2004. Cardiac Expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Involves Novel Exon 1 Usage to Produce a Unique Amino-terminal Protein. *J Biol Chem* 279(16):15877-87.

Davis P.B., 2006. Cystic fibrosis since 1938. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173(5) : 475–482.

Dean M., Hamon Y., Chimini G., 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* 42(7) : 1007–1017.

DeFelice M., Silberschmidt D., DiLauro R., *et al.*, 2003. TTF-1 phosphorylation is required for peripheral lung morphogenesis, perinatal survival, and tissue-specific gene expression. *Journal of Biological Chemistry* 278(37) : 35574-35583.

Denamur E., Chehab F.F., 1994. Analysis of the mouse and rat CFTR promoter regions. *Human molecular genetics* 3(7) : 1089-1094.

Denamur E., Chehab F.F., 1995. Methylation status of CpG sites in the mouse and human CFTR promoters. *DNA Cell Biol.* 14(9) : 811–815.

Dhir A., Buratti E., 2010. Alternative splicing: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies. *FEBS Journal* 277(4) : 841–855.

Diot P., Vecellio-None L., Varaigne F., *et al.*, 2003. Place de la rhDNase dans la mucoviscidose. *Revue des Maladies Respiratoires* 20(2 pt 2) : S171–S175.

Disset A., Michot C., Harris A., *et al.*, 2005. A T3 allele in the CFTR gene exacerbates exon 9 skipping in vas deferens and epididymal cell lines and is associated with congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD). *Human Mutation* 25(1) : 72–81.

Dong J., Jiang G., Asmann Y.W., *et al.*, 2010. MicroRNA Networks in Mouse Lung Organogenesis. *PLoS ONE* 5(5) : e10854.

Dörk T., Wulbrand U., Richter T., *et al.*, 1991. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Human genetics* 87(4) : 441–446.

Drumm M.L., Wilkinson D.J., Smit L.S., *et al.*, 1991. Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254(5039) : 1797–1799.

Durupt S., Nove Josserand R., Durieu I., 2014. Actualité thérapeutique dans la mucoviscidose. *La Revue de Médecine Interne* 35(6) : 388–392.

E

El-Seedy A., Dudognon T., Bilan F., *et al.*, 2009. Influence of the duplication of CFTR exon 9 and its flanking sequences on diagnosis of cystic fibrosis mutations. *The Journal of molecular diagnostics* 11(5) : 488–493.

Elmén J., Lindow M., Schütz S., *et al.*, 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452(7189) : 896–899.

Engelhardt J.F., Yankaskas J.R., Ernst S.A., *et al.*, 1992. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nature genetics* 2(3) : 240–248.

Engelhardt J.F., Zepeda M., Cohn J.A., *et al.*, 1994. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J.Clin.Invest.* 93(2) : 737–749.

F

Faà V., Incani F., Meloni A., *et al.*, 2009. Characterization of a Disease-associated Mutation Affecting a Putative Splicing Regulatory Element in Intron 6b of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene. *Journal of Biological Chemistry* 284(44) : 30024–30031.

Fabbri E., Borgatti M., Montagner G., *et al.*, 2014. Expression of microRNA-93 and interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of proinflammatory responses. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 50(6) : 1144–1155.

Fanen P., Wohllhuter-Haddad A., Hinzpeter A., 2014. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 52 : 94–102.

Fang X., Song Y., Hirsch J., *et al.*, 2006. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 290(2) : L242–249.

Farrell P.M., 2008a. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *Journal of Cystic Fibrosis* 7(5) : 450–453.

Farrell P.M., Rosenstein B.J., White T.B., *et al.*, 2008b. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2) : S4–S14.

Van Der Feltz C., Anthony K., Brilot A., *et al.*, 2012. Architecture of the spliceosome. *Biochemistry* 51(16) : 3321–3333.

Folkesson A., Jelsbak L., Yang L., *et al.*, 2012. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* 10(12) : 841–851.

Friedman K.J., Kole J., Cohn J.A., *et al.*, 1999. Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. *J.Biol.Chem.* 274(51) : 36193–36199.

G

Gabriel S.E., Clarke L.L., Boucher R.C., *et al.*, 1993. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363 (6426) : 263–268.

- Gadsby D.C., Vergani P., Csanády L., 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440(7083) : 477–483.
- Gaj T., Gersbach C., Barbas C.F., 2013. ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology* 31(7) : 397–405.
- Gallati S., 2014. Disease-modifying genes and monogenic disorders: experience in cystic fibrosis. *The application of clinical genetics* 7 : 133–146.
- Gama-Carvalho M., Andrade J., Brás-Rosário L., 2014. Regulation of Cardiac Cell Fate by microRNAs: Implications for Heart Regeneration. *Cells* 3(4) : 996–1026.
- Gao L., Kim K.J., Yankaskas J.R., *et al.*, 1999. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *The American journal of physiology* 277 : L113–L118.
- Garneau N.L., Wilusz J., Wilusz C.J., 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(2) : 113–126.
- Ge Q., Moir L.M., Black J.L., *et al.*, 2010. TGF β 1 induces IL-6 and inhibits IL-8 release in human bronchial epithelial cells: The role of Smad2/3. *Journal of Cellular Physiology* 225(3) : 846–854.
- Gheldof N., Smith E.M., Tabuchi T.M., *et al.*, 2010. Cell-type-specific long-range looping interactions identify distant regulatory elements of the CFTR gene. *Nucleic Acids Research* 38(13) : 4325–4336.
- Gill D.R., Hyde S.C., 2014. Delivery of genes into the CF airway. *Thorax* 69(10) : 962-964.
- Gillen A.E., Gosalia N., Leir S.H., *et al.*, 2011. MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochem J.* 438(1) : 25-32.
- Gonzalez-Hilarion S., Beghyn T., Jia J., *et al.*, 2012. Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet J Rare Dis* 7 : 58.
- Van Goor F., Hadida S., Grootenhuis P.D., *et al.*, 2009. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(44) : 18825–18830.
- Van Goor F., Hadida S., Grootenhuis P.D., *et al.*, 2011. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(46) : 18843–18848.
- Van Goor F., Yu H., Burton B., *et al.*, 2014. Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. *Journal of Cystic Fibrosis* 13(1) : 29–36.
- Gosalia N., Neems D., Kerschner J.L., *et al.*, 2014. Architectural proteins CTCF and cohesin have distinct roles in modulating the higher order structure and expression of the CFTR locus. *Nucleic acids research* 42(15) : 9612-9622.
- Gosalia N., Harris A., 2015. Chromatin Dynamics in the Regulation of CFTR Expression. *Genes* 6(3) : 543–558.

Goss C.H., Muhlebach M.S., 2011. Review: Staphylococcus aureus and MRSA in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 10(5) : 298–306.

Griesenbach U., Scheid P., Hillery E., *et al.*, 2000. Anti-inflammatory gene therapy directed at the airway epithelium. *Gene therapy* 7(4) : 306–313.

Griesenbach U., Alton E.W., 2009. Gene transfer to the lung: Lessons learned from more than 2 decades of CF gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(2) : 128–139.

Gu Y., Harley I.T., Henderson L.B., *et al.*, 2009. Identification of IFRD1 as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease. *Nature* 458(7241) : 1039–1042.

Guillot L., Beucher J., Tabary O., *et al.*, 2014. Lung disease modifier genes in cystic fibrosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 52 : 83–93.

Guimbellot J.S., Fortenberry J.A., Siegal G.P., *et al.*, 2008. Role of oxygen availability in CFTR expression and function. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 39(5) : 514–521.

Gurvich O.L., Tuohy T.M., Howard M.T., *et al.*, 2008. DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. *Annals of Neurology* 63(1) : 81–89.

H

Ha M., Kim V.N., 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15(8) : 509–524.

Halees A.S., El-badrawi R., Khabar K.S., 2008. ARED Organism: Expansion of ARED reveals AU-rich element cluster variations between human and mouse. *Nucleic Acids Research* 36(S1) : 137–140.

Hammond S.M., Wood M.J., 2011. Genetic therapies for RNA mis-splicing diseases. *Trends in Genetics* 27(5) : 196–205.

Hassan F., Nuovo G.J., Crawford M., *et al.*, 2012. MiR-101 and miR-144 Regulate the Expression of the CFTR Chloride Channel in the Lung. *PLoS ONE* 7(11) : e50837.

Haute autorité de santé, 2012a. Bronchitol, rapport de la commission de transparence. 1–41.

Haute autorité de santé, 2012b. KALYDECO. Commission de la transparence.

Haute autorité de santé, 2009. Systématique De La Mucoviscidose En France : État Des Lieux et Perspectives Après 5 Ans De Fonctionnement. 1–174.

Heger P., Wiehe T., 2014. New tools in the box: An evolutionary synopsis of chromatin insulators. *Trends in Genetics* 30(5) : 161–171.

Highsmith W.E., Burch L.H., Zhou Z., *et al.*, 1994. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *The New England journal of medicine* 331(15) : 974–980.

Highsmith W.E., Burch L.H., Zhou Z. *et al.*, 1997. Identification of a splice site mutation (2789 + 5 G>A) associated with small amounts of normal CFTR mRNA and mild cystic fibrosis. *Human Mutation* 9(4) : 332–338.

Hinzpeter A., Aissat A., Sondo E., *et al.*, 2010. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genetics* 6(10) : e1001153.

Hinzpeter A., de Becdelièvre A., Bieth E., *et al.*, 2014. Identification of a novel 5' alternative CFTR mRNA isoform in a patient with nasal polyposis and CFTR mutations. *Human mutation* 35(7) : 805–808.

Hofsli E., Sjursen W ;, Prestvik W.S, *et al.*, 2013. Identification of serum microRNA profiles in colon cancer. *British journal of cancer*, 108(8) :1712–9

Homolova K., Zavadakova P., Doktor T.K., *et al.*, 2010. The deep intronic c.903+469T>C mutation in the MTRR gene creates an SF2/ASF binding exonic splicing enhancer, which leads to pseudoexon activation and causes the cbLE type of homocystinuria. *Human Mutation* 31(4) : 437–444.

Hua Y., Sahashi K., Hung G., *et al.*, 2010. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes and Development* 24(15) : 1634–1644.

Hull J., Shackleton S., Harris A., 1993. Abnormal mRNA splicing resulting from three different mutations in the CFTR gene. *Human molecular genetics* 2(6) : 689–692.

Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J., *et al.*, 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346(6282) : 362–365.

I

Ikpa P.T., Bijvelds M.J., de Jonge H.R., 2014. Cystic fibrosis: Toward personalized therapies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 52 : 192–200.

J

Jacobsen A., Wen J., Marks D.S., *et al.*, 2010. Signatures of RNA binding proteins globally coupled to effective microRNA target sites. *Genome Research* 20(8) : 1010–1019.

Jacquot J., Tabary O., Le Rouzic P., *et al.*, 2008. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(9) : 1703–1715.

Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J., *et al.*, 2013. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England journal of medicine* 368(18) : 1685–94.

Javier R.M., Jacquot J., 2011. Bone disease in cystic fibrosis: What's new? *Joint Bone Spine*, 78(5) : 445–450.

Jiang Q., Engelhardt J.F., 1998. Cellular heterogeneity of CFTR expression and function in the lung: implications for gene therapy of cystic fibrosis. *European journal of human genetics* : EJHG 6(1) : 12–31.

Jing Q., Huang S., Guth S., *et al.*, 2005. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120(5) : 623–634.

K

- Kälin N., Claass A., Sommer M., *et al.*, 1999. DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 103(10) : 1379–1389.
- Kamath K.S., Kumar S.S., Kaur J., *et al.*, 2015. Proteomics of hosts and pathogens in cystic fibrosis. *PROTEOMICS - Clinical Applications* 9(1-2), pp.134–146.
- Kapinas K., Delany A.M., 2011. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Research & Therapy* 13(3) : 220.
- Kerbiriou M., Le Drévo M.A., Férec C., *et al.*, 2007. Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1772(11-12) : 1236–1249.
- Kerem E., Konstan MW., De Boeck K., *et al.*, 2014. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet Respiratory Medicine* 2(7) : 539–547.
- Kerschner J.L., Harris A., 2012. Transcriptional network driving enhancer function in the CFTR gene. *Biochemical Journal* 446(2) : 203–212.
- Kerschner J.L., Gosalia N., Leir S.H. *et al.*, 2014. Chromatin remodeling mediated by the FOXA1/A2 transcription factors activates CFTR expression in intestinal epithelial cells. *Epigenetics* 9(4) : 557–565.
- Khan T.Z., Wagener J.S., Bost T., *et al.*, 1995. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 151(4) : 1075–1082.
- Kiesewetter S., Macek M., Davis C., *et al.*, 1993. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nature genetics* 5(3) : 274–278.
- Kim D.H., Saetrom P., Snøve O., *et al.*, 2008. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(42) : 16230–16235.
- Kim H.H., Kuwano Y., Srikantan S., *et al.*, 2009. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes & Development* 23(15) : 1743–1748.
- Kim S.J., Skach W.R., 2012. Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Frontiers in Pharmacology* 3 : 201.
- Kim V.N., Han J., Siomi M.C., 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(2) : 126–139.
- Knorre A., Wagner M., Schaefer H.E., *et al.*, 2002. DeltaF508-CFTR causes NF-kappaB activation through an ER-overload response in cystic fibrosis lung. *Biol Chem*, 383(2) : 271–282.
- Koh J., Sferra T.J., Collins F.S., 1993. Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator promoter region: Chromatin context and tissue-specificity. *Journal of Biological Chemistry* 268(21) : 15912–15921.

Kreda S.M., *et al.*, 2005. Characterization of wild-type and DF508 Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator in Human Respiratory Epithelia. *Molecular biology of the cell* 16(1) : 2154–2166.

Kreda S.M., Davis C.W., Rose M.C., 2012. CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(9) : a009589.

Krützfeldt J., Rajewsky N., Braich R., *et al.*, 2005. Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs”. *Nature* 438(7068) : 685-689.

Kumar P., Bhattacharyya S., Peters K.W., *et al.*, 2015. MiR-16 rescues F508del-CFTR function in native cystic fibrosis epithelial cells. *Gene Therap* 22(11) : 908-16.

L

Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., *et al.*, 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294(5543) : 853-858.

Landford R.E., Hildebrandt-Eriksen E.S., Petri A., *et al.*, 2010. Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic HepatitisC Virus infection. *Science* 327(5962) : 198-201.

Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., *et al.*, 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294(5543) : 858-862.

Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V., 1993. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5) : 843-54.

Lee Y., Rio D.C., 2014. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry* 84 : 291-323.

Lentz J.J., Jodelka F.M., Hinrich A.J., *et al.*, 2013. Rescue of hearing and vestibular function by antisense oligonucleotides in a mouse model of human deafness. *Nature Medicine* 19(3) : 345-50.

Di Leva G., Croce C.M., 2013. MiRNA profiling of cancer. *Current Opinion in Genetics and Development* 23(1) : 3-11.

Lewandowska M., Costa F.F., Bischof J.M., *et al.*, 2010. Multiple mechanisms influence regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene promoter. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 43(3) : 334-341.

Lewandowska M. ; *et al.*, 2013. The missing puzzle piece: Splicing mutations. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6(12) : 2675–2682.

Li S., Moy L., Pittman N., *et al.*, 1999. Transcriptional Repression of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene, Mediated by CCAAT Displacement Protein/cut Homolog, Is Associated with Histone Deacetylation. *The Journal of biological chemistry* 274(12) : 7803–7815.

Li S., Aufiero B., Schiltz R.L., *et al.*, 2000. Regulation of the homeodomain CCAAT displacement/cut protein function by histone acetyltransferases p300/CREB-binding protein

(CBP)-associated factor and CBP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(13) : 7166–7171.

Li Z., Rana T.M., 2014. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* 13(8) : 622–638.

Linde L., Boelz S., Nissim-Rafinia M., *et al.*, 2007. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *Journal of Clinical Investigation* 117(3) : 683-692.

Linsdell P., Hanrahan J.W., 1998. Glutathione permeability of CFTR. *The American journal of physiology* 275(1 Pt 1) : C323–C326.

Lopez E., Viart V., Guittard C., *et al.*, 2011. Variants in CFTR untranslated regions are associated with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Journal of medical genetics* 48(3) : 152–159.

Lu Y.C., Chen H., Fok K.L., *et al.*, 2012. CFTR mediates bicarbonate-dependent activation of miR-125b in preimplantation embryo development. *Cell Research* 22(10) : 1453–1466.

Lukacs G.L., Mohamed A., Kartner N., *et al.*, 1994. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *The EMBO journal* 13(24) : 6076–6086.

Lukowski S.W., Bombieri C., Trezise A., 2011. Disrupted posttranscriptional regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by a 5'UTR mutation is associated with a *cftr*-related disease. *Human Mutation* 32(10) : 2266–2282.

Lukowski S.W., Rothnagel J., Trezise A., 2015. CFTR mRNA expression is regulated by an upstream open reading frame and RNA secondary structure in its 5' untranslated region. *Human Molecular Genetics* 24(4) : 899–912.

M

Maeda Y., Davé V., Whitsett J., 2007. Transcriptional control of lung morphogenesis. *Physiological reviews* 87(1) : 219–244.

Mall M., Galiotta L.J., 2015. Targeting ion channels in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 14(5) : 561-570

Mann M.J., Dzau V.J., 2000. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligonucleotides. *Journal of Clinical Investigation* 106(9) : 1071-1075.

Marcet B., Chevalier B., Luxardi G., *et al.*, 2011. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature Cell Biology* 13(6) : 693-699.

Matthews R.P., McKnight G.S., 1996. Characterization of the cAMP response element of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene promoter. *The Journal of biological chemistry* 271(50) : 31869-31877.

McCarthy V.A., Harris A., 2005. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatric Pulmonology* 40(1) : 1-8.

McDonald R.A., Matthews R.P., Idzerda R.L. *et al.*, 1995. Basal expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is dependent on protein kinase A activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(16) : 7560-7564.

McNeer N.A., Anandalingam K., Fields R.J., *et al.*, 2015. Nanoparticles that deliver triplex-forming peptide nucleic acid molecules correct F508del CFTR in airway epithelium. *Nature Communications* 6 : 6952.

Megiorni F., Cialfi S., Dominici C., *et al.*, 2011. Synergistic post-transcriptional regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *PLoS ONE* 6(10) : e26601.

Megiorni F., Cialfi S., Cimino G., *et al.*, 2013. Elevated levels of miR-145 correlate with SMAD3 down-regulation in Cystic Fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis* 12(6) : 797–802.

Meili D., Kralovicova J., Zagalak J., *et al.*, 2009. Disease-causing mutations improving the branch site and polypyrimidine tract: Pseudoexon activation of LINE-2 and antisense Alu lacking the poly(T)-tail. *Human Mutation* 30(5) : 823–831.

Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. *et al.*, 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(30) : 10513–10518.

Moribe T., Iizuka N., Miura T., *et al.*, 2009. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 125(2) : 388-397.

Mouchel N., Broackes-Carter F., Harris A., 2003. Alternative 5' exons of the CFTR gene show developmental regulation. *Human Molecular Genetics* 12(7) : 759-769.

Mouchel N., Henstra S.A., McCarthy V.A., *et al.*, 2004. HNF1 α is involved in tissue-specific regulation of CFTR gene expression. *Biochemical Journal* 378(Pt 3) : 909-918.

Muhlebach M.S., Stewart P.W., Leigh M.W., *et al.*, 1999. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160(5) : 186–191.

\mathcal{N}

Nakamura M., Yoshimura K., Bajocchi G., *et al.*, 1992. Tumor necrosis factor modulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *FEBS Lett.* 314(3) : 366-70.

Niksic M., Romano M., Buratti E., *et al.*, 1999. Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9. *Human molecular genetics* 8(13) : 2339–2349.

Nissim-Rafinia, M., Linde, L. & Kerem, B., 2006. The CFTR Gene: Structure, Mutations and Specific Therapeutic approaches, *Cystic Fibrosis in the 21st Century*, Chapter 1 page 3-10

Nuthall H.N., Vassaux G., Huxley C., *et al.*, 1999a. Analysis of a DNase I hypersensitive site located -20.9 kb upstream of the CFTR gene. *European Journal of Biochemistry* 266(2) : 431-43.

Nuthall H.N., Moulin D.S., Huxley C. *et al.*, 1999b. Analysis of DNases-I-hypersensitive sites at the 3' end of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR). *Biochem J.* 34 : 601-11.

O

Oglesby I.K., Bray I.M., Chotirmall S.H. *et al.*, 2010. MiR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *Journal of immunology* 184(4) : 1702-1709.

Oglesby I.K., Vencken S.F., Agrawal R., *et al.*, 2015a. MiR-17 overexpression in cystic fibrosis airway epithelial cells decreases interleukin-8 production. *European Respiratory Journal* 46(5) : 1350-1360.

Oglesby I.K., Agrawal R., Mall M.A., *et al.*, 2015b. MiRNA-221 is elevated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates expression of ATF6. *Molecular and Cellular Pediatrics* 2(1) : 1.

Oglesby I.K., Chotirmall S.H., McElvaney N.G., *et al.*, 2013. Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by microRNA-145, -223, and -494 is altered in $\Delta F508$ cystic fibrosis airway epithelium. *J Immunol* 190(7) : 3354-3362.

Ott C.J., Suszko M., Blackledge N.P. *et al.*, 2009a. A complex intronic enhancer regulates expression of the CFTR gene by direct interaction with the promoter. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13(4) : 680-692.

Ott C.J., Blackledge N.P., Kerschner J.L. *et al.*, 2009b. Intronic enhancers coordinate epithelial-specific looping of the active CFTR locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(47) : 19934-19939.

Ott C.J., Blackledge N.P., Leir S.H., *et al.*, 2009c. Novel regulatory mechanisms for the CFTR gene. *Biochemical Basis of Respiratory disease* 37 : 843-848.

Ott C.J., Bischof J.M., Unti K.M., *et al.*, 2012. Nucleosome occupancy reveals regulatory elements of the CFTR promoter. *Nucleic Acids Research* 40(2) : 625-637.

Ouellet C., Bilodeau G., Cantin A.M., 2007. Oxidative stress, smoking and CFTR: can cystic fibrosis be acquired? *Med Sci* 23(1) : 9-10.

P

Pagani F., Buratti E., Stuani C., *et al.*, 2002. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. *Nature Genetics* 30(4) : 426-429.

Pagani F., Stuani C., Tzetis M., *et al.*, 2003. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Human Molecular Genetics* 12(10) : 1111-1120.

Paul T., Li S., Khurana S. *et al.*, 2007. The epigenetic signature of CFTR expression is coordinated via chromatin acetylation through a complex intronic element. *The Biochemical journal* 408(3) : 317–326.

Pedrotti S., Cooper T.A., 2014. In Brief: (Mis)splicing in disease. *The Journal of Pathology* 233(1) : 1–3.

Penque D., Mendes F., Beck S., *et al.*, 2000. Cystic fibrosis F508del patients have apically localized CFTR in a reduced number of airway cells. *Laboratory investigation* 80(6) : 857–868.

Pérez B., Rincón A., Jorge-Finnigan A. *et al.*, 2009. Pseudoexon exclusion by antisense therapy in methylmalonic aciduria (MMAuria). *Human Mutation* 30(12) : 1676–1682.

Pettit R.S., Fellner C., 2014. CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *P & T* 39(7) : 500-11.

Phylactides M., Rowntree R., Nuthall H., *et al.*, 2002. Evaluation of potential regulatory elements identified as DNase I hypersensitive sites in the CFTR gene. *European Journal of Biochemistry* 269(2) : 553–559.

Pittman N., Shue G., LeLeiko N.S., *et al.*, 1995. Transcription of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a CCAAT-like element for both basal and cAMP-mediated regulation. *Journal of Biological Chemistry* 270(48) : 28848-28857.

Place R.F., Li L.C., Pookot D., *et al.*, 2008. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(5) : 1608-1613.

Pranke I.M., Sermet-Gaudelus I., 2014. Biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The international journal of biochemistry & cell biology* 52 : 26-38.

R

Rab A., Bartoszewski R., Jurkuvenaite A. *et al.*, 2007. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(2) : C756-C766.

Radpour R., Taherzadeh-Fard E., Gourabi H., *et al.*, 2009. Novel cause of hereditary obstructive azoospermia: a T2 allele in the CFTR gene. *Reproductive biomedicine online* 18(3) : 327–332.

Ramachandran S., Karp P.H., Jiang P., *et al.*, 2012. A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and F508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(33) : 13362–13367.

Ramachandran S., Karp P.H., Osterhaus S.R., *et al.*, 2013. Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by MicroRNAs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49(4) : 544-451.

- Ramalho A.S., Beck S., Meyer M. *et al.*, 2002. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 27(5) : 619–627.
- Ratjen F., Durham T., Navratil T. *et al.*, 2012. Long term effects of denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 11(6) : 539–549.
- Rayner C.F., Rutman A., Dewar A., *et al.*, 1995. Ciliary disorientation in patients with chronic upper respiratory tract inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 151 : 800–804.
- Regnier A., Dannhoffer L., Blouquit-Laye S. *et al.*, 2008. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human distal lung. *Human Pathology* 39(3) : 368–376.
- Reinhart B.J., Slack F.J., Basson M., *et al.*, 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403(6772) : 901–906.
- Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., *et al.*, 2002. MicroRNAs in plants. *Genes & Development* 16(13) : 1616–1626.
- Reisin I.L., Prat A.G., Abraham E.H., *et al.*, 1994. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *The Journal of biological chemistry* 269(32) : 20584–20591.
- Ren H.Y., Grove D.E., De La Rosa O., *et al.*, 2013. VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Molecular Biology of the cell* 24(19) : 3016–3024.
- René C., Taulan M., Iral F., *et al.*, 2005. Binding of serum response factor to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CARG-like elements, as a new potential CFTR transcriptional regulation pathway. *Nucleic Acids Research* 33(16) : 5271–5290.
- René C. Lopez E., Claustres M., *et al.*, 2010. NF-E2-related factor 2, a key inducer of antioxidant defenses, negatively regulates the CFTR transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(13) : 2297–2309.
- Rennolds J., Butler S., Maloney K., *et al.*, 2010. Cadmium regulates the expression of the CFTR chloride channel in human airway epithelial cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 116(1) : 349–358.
- Rhoades M.W., Reinhart B.J., Lim L.P., *et al.*, 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110(4) : 513–520.
- Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., *et al.*, 1989. Identification the Cystic Fibrosis Gene : Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* 245(4922) : 1066–1073.
- Romey M.C., Guittard C., Carles S., *et al.*, 1999. First putative sequence alterations in the minimal CFTR promoter region. *Journal of medical genetics* 36(3) : 263–264.

Romey M.C., Pallares-Ruiz N., Mange A. *et al.*, 2000. A naturally occurring sequence variation that creates a YY1 element is associated with increased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression. *The Journal of biological chemistry* 275(5) : 3561-3567.

Van Rooij E., Olson E.N., 2012. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nature Reviews Drug Discovery* 11(11) : 860–872.

Van Rooij E., Purcell A.L., Levin A. A., 2012. Developing MicroRNA therapeutics. *Circulation Research* 110(3) : 496–507.

Van Rooij E., Kauppinen S., 2014. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO molecular medicine* 6(7) : 851-64.

Rowe S.M., Miller S., Sorscher E.J., 2005. Cystic fibrosis. *The new england journal of medicine* 352(19) : 1992-2001.

Rowe S.M., Sloane P., Tang L.P. *et al.*, 2011. Suppression of CFTR premature termination codons and rescue of CFTR protein and function by the synthetic aminoglycoside NB54. *Journal of Molecular Medicine* 89(11) :1149–1161.

Rowntree R., Harris A., 2002. DNA polymorphisms in potential regulatory elements of the CFTR gene alter transcription factor binding. *Human Genetics* 111(1) : 66–74.

Rowntree R.K., Vassaux G., McDowell T.L., *et al.*, 2001. An element in intron 1 of the CFTR gene augments intestinal expression in vivo. *Human molecular genetics* 10(14) : 1455–1464.

Rowntree R.K., Harris A., 2003. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Annals of Human Genetics* 67(5) : 471–485.

Rozmahel R., Heng H.H., Duncan A.M., *et al.*, 1997. Amplification of CFTR exon 9 sequences to multiple locations in the human genome. *Genomics* 45(3) : 554–561.

Rutland J. Penketh A., Griffin W.M., *et al.*, 1983. Cystic fibrosis serum does not inhibit human ciliary beat frequency, *Am Rev Respir Dis*, 128(6) : 1030–1034.

S

Sancho A., Li S., Paul T., *et al.*, 2015. CHD6 regulates the topological arrangement of the CFTR locus. *Human Molecular Genetics* 24(10) : 2724–2732.

Schembri F., Sridhar S., Perdomo C., *et al.*, 2009. MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(7) : 2319-24.

Schwank G., Koo B.K., Sasselli V., *et al.*, 2013. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 13(6) : 653–658.

Schwiebert E.M., Benos D.J., Egan M.E., *et al.*, 1999. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiological reviews* 79(1 Suppl) : S145–S166.

- Sermet-Gaudelus I., Vallée B., Urbin I., *et al.*, 2002. Normal function of the cystic fibrosis conductance regulator protein can be associated with homozygous $\Delta F508$ mutation. *Pediatric Research* 52(5) : 628–635.
- Sermet-Gaudelus I., Renouil M., Fajac A., *et al.*, 2007. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC medicine* 5 : 5.
- Sermet-Gaudelus I., Boeck K.D., Casimir G.J. *et al.*, 2010. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 182(10) : 1262–1272.
- Serohijos A.W., Hegedus T., Aleksandrov A.A., *et al.*, 2008. Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(9) : 3256–61
- Sessa R., Hata A., 2014. Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulm Circ.* 3(2) : 315–328.
- Shed E.F., Haworth C.S., Condliffe A.M., *et al.*, 2007. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 62(7) : 650–651.
- Sheppard D.N., Rich D.P., Ostedgaard L.S., *et al.*, 1993. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* 362(6416) : 160–164.
- Sheppard D.N., Welsh M.J., 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological reviews* 79(1 Suppl) : S23–S45.
- Sherrard L.J., Tunney M.M., Elborn J.S., 2014. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *The Lancet* 384(9944) : 703–713.
- Singh R.K., Cooper T.A., 2012. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* 18(8) : 472–482.
- Smith A.N., Wardle C.J., Harris A., 1995. Characterization of Dnase I Hypersensitive Sites in the 120 kb 5' to the CFTR gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 211(1) : 274–281.
- Smith A.N., Barth M.L., McDowell T.L., *et al.*, 1996. A regulatory element in intron 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *The Journal of biological chemistry* 271(17) : 9947–9954.
- Smith D.J., Nuthall H.N., Majetti M.E., *et al.*, 2000. Multiple potential intragenic regulatory elements in the CFTR gene. *Genomics* 64(1) : 90–96.
- Son J.W., Kim Y.J., Cho H.M., *et al.*, 2011. Promoter hypermethylation of the CFTR gene and clinical/pathological features associated with non-small cell lung cancer. *Respirology* 16(8) : 1203–1209.
- Sosnay P.R., Castellani C., Corey M., *et al.*, 2011. Evaluation of the Disease Liability of CFTR Variants. *Cystic Fibrosis, Methods in Molecular Biology* 742 : 355–372.

Sterne-Weiler T., Sanford J.R., 2014. Exon identity crisis: disease-causing mutations that disrupt the splicing code. *Genome biology* 15(1) : 201.

Strong T.V., Wilkinson D.J., Mansoura M.K. *et al.*, 1993. Expression of an abundant alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with a cAMP-activated chloride conductance. *Human molecular genetics* 2(3) : 225–230.

Stutts M.J., Canessa C.M., Olsen J.C., *et al.*, 1995. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269(5225) : 845–850.

Sun G., Li H., Rossi J.J., 2010. Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Research* 38(1) : 239–252.

Swanson J., 2006. CFTR: helping to acidify macrophage lysosomes. *Nature cell biology* 8(9) : 908–909.

T

Taulan M., Lopez E., Guittard C. *et al.*, 2007. First functional polymorphism in CFTR promoter that results in decreased transcriptional activity and Sp1/USF binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361(3) : 775–781.

Thulasingham S., Massilamany C., Gangaplara A., *et al.*, 2011. MiR-27b*, an oxidative stress-responsive microRNA modulates nuclear factor-kB pathway in RAW 264.7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 352(1-2) : 181–188.

Thumerelle C., 2003. L'infection respiratoire dans la mucoviscidose : le poids de l'infection dans l'évolution de la mucoviscidose, les prélèvements pour l'étude microbiologique des sécrétions bronchiques et les critères cliniques de l'infection. *Rev Mal Respir* 20(2 Pt 2) : S37-48.

Thurman R.E., Rynes E., Humbert R., *et al.*, 2012. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* 489(7414) : 75–82.

Tildy B.E., Rogers D.F., 2015. Therapeutic Options for Hydrating Airway Mucus in Cystic Fibrosis. *Pharmacology* 95(3-4) : 117–132.

Tizzano E.F., Chitayat D., Buchwald M., 1993. Cell-specific localization of CFTR mRNA shows developmentally regulated expression in human fetal tissues. *Human molecular genetics* 2(3) : 219–224.

Tizzano E.F., O'Brodovich H., Chitayat D., *et al.*, 1994. Regional expression of CFTR in developing human respiratory tissues. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 10(4) : 355-362.

Trapnell B.C., Chu C.S., Paakko P.K., *et al.*, 1991a. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(15) : 6565–6569.

Trapnell B.C., Zeitlin P.L., Chu C.S., *et al.*, 1991b. Down-regulation of cystic fibrosis gene mRNA transcript levels and induction of the cystic fibrosis chloride secretory phenotype in epithelial cells by phorbol ester. *Journal of Biological Chemistry* 266(16) : 10319–10323.

Treize A.E.O., Chambers J.A., Wardle C.J., *et al.*, 1993. Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Human molecular genetics* 2(3) : 213–218.

Treize, A.E.O., 2006. Exquisite and Multilevel Regulation of CFTR Expression. *Cystic Fibrosis in the 21 st Century*, chapter 2, page 11–20.

Tsui L.C., Dorfman R., 2013. The cystic fibrosis gene : a molecular genetic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3(2) : a009472

Tucker S.J., Tannahill D., Higgins, C.F., 1992. Identification and developmental expression of the *Xenopus laevis* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum.Mol.Genet.* 1(2) : 77–82.

V

Varga K., Jurkuvenaite A., Wakefield J., *et al.*, 2004. Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *The Journal of biological chemistry* 279(21) : 22578–22584.

Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A., 2007. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* 318(5858) : 1931-1934.

Veit G., Avramescu R.G., Perdomo D. *et al.*, 2014. Some gating potentiators, including VX-70, diminish DeltaF508-CFTR functional expression. *Sci Transl Med* 6(246), 246ra97.

Vlasova-St Louis I., Bohjanen P.R., 2014. Post-Transcriptional Regulation of Cytokine Signaling by AU-Rich and GU-Rich Elements. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 34(4) : 233–241.

W

Wan L., Zhang L., Fan K., *et al.*, 2014. MiR-27b targets LIMK1 to inhibit growth and invasion of NSCLC cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 390(1-2) : 85–91.

Ward C.L., Kopito R.R., 1994. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *Journal of Biological Chemistry* 269(41) : 25710–25718.

Weber A.J., Soong G., Bryan R., *et al.*, 2001. Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl⁻ channel function. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 281(1) : L71–L78.

Welch E.M., Barton E.R., Zhuo J. *et al.*, 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447(7140) : 87–91.

Weldon S., McNally P., McAuley D.F., *et al.*, 2014. MiR-31 dysregulation in Cystic Fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production. *American journal of respiratory and critical care medicine* 190(2) : 165–74.

White N.L., Higgins C.F., Trezise A.E., 1998. Tissue-specific in vivo transcription start sites of the human and murine cystic fibrosis genes. *Human molecular genetics* 7(3) : 363–369.

Wightman B., Ha I., Ruvkun G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5) : 855–862.

Wilschanski M., Miller L.L., Shoseyov D., *et al.*, 2011. Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *European Respiratory Journal* 38(1) : 59–69.

Wilschanski M., Yahav Y., Yaacov Y., *et al.*, 2003. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *The New England journal of medicine* 349(15) : 1433–1441.

Winter J., Jung S., Keller S., *et al.*, 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11(3) : 228–234.

Wong A.P., Bear C.E., Chin S., *et al.*, 2012. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nature Biotechnology* 30(9) : 876–882

Wong A.P., Rossant J. 2013. Generation of Lung Epithelium from Pluripotent Stem Cells. *Current Pathobiology Reports* 1(2) : 137–145.

Wong A.P., Chani S., Xia S., *et al.*, 2015. Efficient generation of functional CFTR-expressing airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols* 10(3) : 363–381

Wright F.A., *et al.*, 2011. Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nature Genetics* 43(6) : 539–546.

X

Xie C., Zhang J.T., Sun T.T., *et al.*, 2013. CFTR suppresses tumor progression through miR-193b targeting urokinase plasminogen activator (uPA) in prostate cancer. *Oncogene* 32(18) : 2282–2291

Xie Y., *et al.*, 2010. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 67(2) : 170–176.

Xiong Z., Shaibani A., Li Y.P., *et al.*, 2006. Alternative splicing factor ASF/SF2 is down regulated in inflamed muscle. *Journal of clinical pathology* 59(8) : 855–861.

Xu W., Hui C., Yu S.S., *et al.*, 2011. MicroRNAs and cystic fibrosis--an epigenetic perspective. *Cell biology international* 35(5) : 463–466.

Y

Yan F., Shen N., Pang J. *et al.*, 2014. Restoration of miR-101 suppresses lung tumorigenesis through inhibition of DNMT3a-dependent DNA methylation. *Cell Death and Disease* 5 : e1413.

Yigit E., Bischof J.M., Zhang Z. *et al.*, 2013. Nucleosome mapping across the CFTR locus identifies novel regulatory factors. *Nucleic Acids Research* 41(5) : 2857–2868.

Yin R., *et al.*, 2011. MicroRNA-145 suppresses lung adenocarcinoma-initiating cell proliferation by targeting OCT4. *Oncology Reports* 25(6) : 1747–1754.

Yoshimura K., Nakamura H., Trapnell B.C., *et al.*, 1991a. The cystic fibrosis gene has a “housekeeping”-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin. *Journal of Biological Chemistry* 266(14) : 9140–9144.

Yoshimura K., Nakamura H., Trapnell B.C., *et al.*, 1991b. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. *Nucleic acids research* 19(19) : 5417–5423.

Yu L., Todd N.W., Xing L. *et al.*, 2010. Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *International Journal of Cancer* 127(12) : 2870–2878.

Z

Zaman K., Palmer L.A., Doctor A., *et al.*, 2004. Concentration-dependent effects of endogenous S-nitrosoglutathione on gene regulation by specificity proteins Sp3 and Sp1. *The Biochemical journal* 380 : 67–74.

Zamecnik P.C., Raychowdhury M.K., Tabatadze D.R., *et al.*, 2004. Reversal of cystic fibrosis phenotype in a cultured Delta508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cell line by oligonucleotide insertion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21) : 8150–8155.

Zammarchi F., de Stanchina E., Bournazou E., *et al.*, 2011. Antitumorigenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(43) : 17779–17784.

Zhang P.X., Cheng J., Zou S. *et al.*, 2015. Pharmacological modulation of the AKT/microRNA-199a-5p/CAV1 pathway ameliorates cystic fibrosis lung hyperinflammation. *Nature Communications* 6 : 6221.

Zhang S., Smith N., Schuster D., *et al.*, 2011. Quercetin increases CFTR Mediated Chloride Transport and Ciliary Beat Frequency: Therapeutic Implications for Chronic Rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology* 25(5) : 307–312.

Zhang Z., Ott C.J., Lewandowska M.A., *et al.*, 2012. Molecular mechanisms controlling CFTR gene expression in the airway. *Journal of cellular and molecular medicine* 16(6) : 1321–1330.

Zhang Z., Leir S.H., Harris A., 2013. Immune mediators regulate CFTR expression through a bifunctional airway-selective enhancer. *Molecular and cellular biology* 33(15) : 2843–53.

- Zhang Z., Leir, S.H., Harris, A., 2015. Oxidative Stress Regulates CFTR Gene Expression in Human Airway Epithelial Cells through a Distal Antioxidant Response Element. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 52(3) : 387–396.
- Zhao Y., Guo S., Sun J., *et al.*, 2012. Methylcap-seq reveals novel DNA methylation markers for the diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer in a chinese population. *PLoS ONE* 7(4) : e35175.
- Zheng W., Kuhlicke J., Jäckel K., *et al.*, 2009. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-mediated repression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the intestinal epithelium. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(1) : 204–213.
- Zhou H., Rigoutsos I., 2014. MiR-103a-3p targets the 5 ' UTR of GPRC5A in pancreatic cells. *RNA* 20(9) : 1431-9.
- Zhou L., Dey C.R., Wert S.E. *et al.*, 1997. Hepatocyte nuclear factor-3beta limits cellular diversity in the developing respiratory epithelium and alters lung morphogenesis in vivo. *Developmental Dynamics* 210(3) : 305–314.
- Zhou Z., Licklider L.J., Gygi S.P., *et al.*, 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419(6903) : 182–185.
- Zhou Z., Duerr J., Johanneson B. *et al.*, 2011. The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis* 10; Suppl 2 : S172-82.
- Zielenski J., Bozon D., Markiewicz D., *et al.*, 1993. Analysis of CFTR transcripts in nasal epithelial cells and lymphoblasts of a cystic fibrosis patient with 621 + 1G-->T and 711 + 1G-->T mutations. *Human molecular genetics* 2(6) : 683–687.

Sites internet

- Cystic Fibrosis Foundation > <https://www.cff.org/>
- dbSNP > <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
- Ensembl > <http://www.ensembl.org/index.html>
- Genet.sickkids > <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>
- KEGG Pathway > <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
- miRBase > <http://mirbase.org/>
- miRTAr > <http://mirtar.mbc.nctu.edu.tw/human/>
- miRStart > <http://mirstart.mbc.nctu.edu.tw/>
- starBase > <http://starbase.sysu.edu.cn/>
- Servier > <http://www.servier.fr/>
- sRNAbench > <http://bioinfo5.ugr.es/sRNAbench/sRNAbench.php>
- USCS > <https://genome.ucsc.edu/>

Figures

* Certaines images ont été créées à partir d'éléments issus de la banque d'image PowerPoint présente en libre accès sur le site internet Servier (Servier Medical Art > banques d'images PowerPoint).

(Éléments issu de Servier Medical Art : figure 2 (état de l'art) : appareil reproducteur, foie, intestins, pancréas, poumons; figure 15,16 & 17(état de l'art) : molécule d'ADN; figure 27(état de l'art) : cellule, chromosomes; figure 30(état de l'art) : rein, poumons, intestin, pancréas; figure 32(état de l'art) : cellule épithéliale, molécules ADN/ARN, chromosomes, canal protéique; figure 33(état de l'art) : neutrophiles; figure 1(article 1) : molécule d'ADN; figure 3(article 1) : molécule d'ADN, canal protéique; figure 1(Dérégulation des miARNs dans les modèles ALI CF et non-CF) : cellules, bronches, ARN; figure 14(Dérégulation des miARNs dans les modèles ALI CF et non-CF) : bronches).

* Autres sources utilisées pour la création d'image

Figure 2 (état de l'art) : illustration de la peau

> <http://www.antiperspirantsinfo.com/fr/Resources/Images/sweat-gland-fr717-195181.png>

Figure 12 (état de l'art) : illustration des organes atteints par la mucoviscidose

> <http://svtmarcq.over-blog.com/article-variation-genetique-et-sante-1ere-s-103390766.html>

Figure 13 (état de l'art) : illustration de l'épithélium respiratoire

> http://ecours.unice.fr/radiographie_blaive/disciplines/niveaudiscipline/pneumologie/lecon1/IMG-2-41.jpg

Figure 14 (état de l'art) : illustration du nouveau-né

> <http://azcoloriage.com/dessin-naissance-bebe>

Figure 14 (état de l'art) : illustration du développement du poumon

> http://epar.iplesp.upmc.fr/site_respirare/index.php/fr/dev

Figure 14 (état de l'art) : illustration du gène (introns et exons)

Adapté de Lap-Chee Tsui & Ruslan Dorfman 2013 (voir références bibliographiques)

Figure 1 & 14(Dérégulation des miARNs dans les modèles ALI CF et non-CF) : illustration des polypes

> <http://www.doctorette.info/maladies-ori/polypes-du-nez>

Figure 1 & 14(Dérégulation des miARNs dans les modèles ALI CF et non-CF) : illustration du nez

> https://fr.wikipedia.org/wiki/Bulbe_olfactif

Figure 1 & 14(Dérégulation des miARNs dans les modèles ALI CF et non-CF) : illustration de la culture en interface air liquide

> <http://www.stemcell.com/zh-CN/Products/Popular-Product-Lines/PneumaCult.aspx>