

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

**ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE BIOLOGIE**

Année 2007

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

La mucoviscidose :  
Correction de la mutation  $\Delta F508$  par sur-expression de NHE-RF1 ;  
Modifications d'expression de NHE-RF1 et des récepteurs  
 $\beta$ -adrénergiques dans les poumons humains.

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

Spécialité : Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Florian BOSSARD**

*Le 10 décembre 2007, devant le jury ci-dessous*

<i>Président</i>	M <sup>me</sup> LEMARCHAND Patricia, PU-PH · Université de Nantes
<i>Rapporteurs</i>	M. BENHAROUGA Mohamed, MCU · Université de Grenoble M <sup>me</sup> FANEN Pascale, MCU-PH · Université de Paris XII
<i>Examineur</i>	M. BECQ Frédéric, PU · Université de Poitiers
<i>Directeur de thèse :</i>	M <sup>me</sup> GAUTHIER Chantal, PU · Université de Nantes

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier en premier lieu mes parents de m'avoir encouragé et avoir fait le maximum pour que je puisse poursuivre mes études jusqu'à aujourd'hui.

Je remercie Chantal GAUTHIER de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir fait confiance pour mener cette thèse. Je la remercie également pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et sa volonté de nous accompagner au-delà de la thèse dans la réussite de notre vie professionnelle et personnelle. Je la remercie aussi pour ses talents de cuisinière dont elle a su nous faire profiter régulièrement.

Je remercie les membres de mon jury : Pascale FANEN, Mohamed BENHAROUGA, Frédéric BECQ et Patricia LEMARCHAND d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie particulièrement Mohamed BENHAROUGA de m'avoir guidé et conseillé objectivement dans ma prise de décision sur mon choix de "post-doc".

Je remercie Pierre PACAUD, directeur de l'unité 533, de m'avoir encouragé très tôt (en Licence) à découvrir le monde de la recherche par un stage "environnemental".

J'ai une pensée particulière pour Denis ESCANDE qui poussait les étudiants à donner le meilleur d'eux-mêmes et qui était là pour les soutenir quand il le fallait.

Je remercie Audrey LINDA LORCA de m'avoir encouragé à faire une thèse. Je ne le regrette pas aujourd'hui.

Je remercie Amal ROBAY de m'avoir confié la suite de son projet scientifique et de m'avoir enseigné les techniques qu'elle maîtrisait. Je remercie également Gilles TOUMANIANTZ de m'avoir appris, toujours de bonne humeur et en sifflant, les techniques et les rudiments de la biologie moléculaire.

Je remercie ensuite les membres de l'équipe : Camille, Leslie, Thuy, Bertrand, Émilie, Emmanuelle, Mortéza, Nolwenn pour leur amitié, leur soutien, leur bonne humeur et les gourmandises qu'ils pouvaient amener au laboratoire pour le plus grand plaisir de chacun. J'adresse un merci spécial à Thuy (aussi connu sous les noms de François-Xavier, Jean-Paul, Juan-Paolo Delgado Sancho de la Pampa, TTQ, ...) pour sa mauvaise foi qui nous a bien fait rire (après parfois nous avoir mis en colère), pour sa bonne humeur, son accent et ses

expressions inimitables (c'est pas possible à 35 ans, tu rigoles ou pas ?). Merci également à Leslie et Thuy (encore lui!) ainsi qu'à Cécile d'avoir partagé avec moi des vacances en Espagne qui resteront un souvenir inoubliable.

Je remercie Cécile d'être là, tout simplement. Je la remercie aussi de me supporter quand je suis jacky, et de bien vouloir me suivre au Canada.

Je remercie tous ceux que j'ai côtoyés pendant ces années à l'unité 533 pour leurs sourires, les discussions dans les couloirs, leurs conseils et tous les bons moments partagés au laboratoire ou en dehors.

Je remercie Gilles LAMBERT pour ses conseils aussi bien scientifiques que personnels, et pour ces bons moments partagés lors des déjeuners du vendredi.

Je remercie toute la bande d'amis du "Lotiss" : Steve, Pierre, Seb, Émeric, Julien, Chnibou, Laurent, Damien, Richard (les garçons d'abord, une fois n'est pas coutume) et les filles (le meilleur pour la fin) Anne, Barbara, Solène, Karine, Céline, Cécile Wesh-Wesh, mais aussi Loz ze Bloss, Alain et Dani, Jean-Loulou et Annie pour leur présence et leur amitié depuis de longues années. Merci à eux pour les soirées challenges, les strip-teases devant 200 personnes, la cholite ischémique de Steve, l'accident de scooter avec Chnibou, la dame blanche avec Julien en revenant du casino, la nuit Label 5 dans le coffre de la voiture à Andorre avec Damien, la chicorée et le pipo avec Pierre quand on était champions du monde, les soirées au Duplex avec Émeric et Chnibou, et tous les autres bons moments que les défaillances de ma mémoire ou la décence m'empêchent de citer ici. On prend tous des chemins différents mais j'espère que, malgré la distance géographique, cela ne nous éloignera pas.

Je remercie Rachid Boulaouane pour le Combo, pour les soirées aux courses et pour ses encouragements, son aide et ses conseils immobiliers.

Je remercie les différents établissements de nuit de Nantes, La Baule et quelquefois Paris ou Montpellier, qui ont fait appel à mes talents de DJ et qui ont ainsi participé (sans le savoir) à financer ces années d'études.

## **AVANT-PROPOS**

Je suis arrivé à l'unité INSERM UMR 533 de "l'institut du thorax" à Nantes en 2002 pendant mon année de Licence pour un stage dit « environnemental » d'observation et de découverte du monde de la recherche. Pour ce stage, j'ai été accueilli dans l'équipe du Dr Bruno PITARD. Il m'a ensuite proposé de revenir l'année suivante pour effectuer mon stage de TER (Travail d'Étude et de Recherche) de Maîtrise (aujourd'hui Master1). Je me suis intéressé pendant ce stage au transfert de gène et plus particulièrement aux polymères synthétiques utilisés comme vecteurs pour acheminer les gènes d'intérêt dans les cellules. En DEA (Master2), j'ai continué à travailler sur le transfert de gène avec pour application un modèle de souris atteint d'une maladie génétique fréquente chez l'Homme, la myopathie de Duchenne. Cette maladie a pour cause l'absence fonctionnelle d'une protéine, la dystrophine, à la membrane des cellules musculaires. Lors de ce stage, j'ai mis en évidence que les vecteurs synthétiques du Dr Bruno PITARD permettent le transfert de gènes rapporteurs (luciférase, Green Fluorescent Protein GFP) dans les muscles abîmés par la pathologie chez ces souris. De plus, le transfert d'un gène codant une dystrophine tronquée mais fonctionnelle permet de restaurer à la membrane des cellules musculaires tout le complexe protéique associé à la dystrophine normale. La restauration de ce complexe multi-protéique atteste d'une activité musculaire potentiellement améliorée. Ce travail a fait l'objet d'une publication (voir en annexe) et sa présentation lors de l'examen oral du DEA a permis au Dr Chantal GAUTHIER de découvrir mes travaux. Elle m'a alors proposé un projet de thèse lié à une autre maladie génétique fréquente, la mucoviscidose. Ce projet m'offrait la possibilité, en plus d'apprendre de nouvelles techniques, de découvrir et mieux comprendre certains aspects des mécanismes de régulation de CFTR, la protéine responsable de la maladie. J'ai ainsi accepté cette proposition de thèse, ce qui m'a conduit à changer d'équipe de recherche et de thématique tout en restant dans l'unité INSERM UMR 533.

J'ai donc intégré l'équipe du Dr GAUTHIER à la fin de l'été 2004. Je me suis progressivement approprié le sujet de thèse avec l'aide d'Amal ROBAY, alors en fin de doctorat, qui m'a enseigné les techniques de micro-injection intranucléaire et de microcytofluorimétrie. J'ai eu la chance d'obtenir une bourse de thèse du ministère en novembre 2004, ce qui m'assurait un financement de 3 ans pour réaliser ma thèse. La première partie de ma thèse a été de poursuivre un travail prometteur initié par Amal ROBAY sur une protéine partenaire de CFTR. Mon expérience de DEA en transfection et en immunomarquage s'est avérée utile. Néanmoins, il m'a fallu apprendre de nouvelles techniques pour le conduire jusqu'à sa publication, mais également pour mener un second

projet axé sur l'analyse comparée de prélèvements bronchiques humains contrôlés et mucoviscidosiques. Par ailleurs, une collaboration avec les équipes CNRS de Jean-Luc DECOUT à Grenoble et de Frédéric BECQ à Poitiers m'a permis de participer à la caractérisation de nouveaux inhibiteurs de CFTR. Ces travaux ont également fait l'objet d'une publication présentée en annexe.

On m'avait dit que les 3 années de thèse passent très vite. Je m'en rends compte aujourd'hui à l'heure de dresser le bilan de ces années d'apprentissage de la recherche dont ce manuscrit est l'aboutissement. Le doctorat n'est qu'une étape mais elle est importante car c'est la dernière de la vie étudiante (à priori). C'est la clé pour ouvrir la voie sur une carrière pleine d'inconnues mais dont j'ai hâte d'écrire la suite.

# **TABLES DES MATIÈRES**

# INTRODUCTION

<b>I- LA MUCOVISCIDOSE : PHYSIOPATHOLOGIE.....</b>	<b>1</b>
<b>1- Atteintes respiratoires .....</b>	<b>2</b>
<b>2- Atteintes digestives.....</b>	<b>5</b>
1- Manifestations gastro-intestinales.....	5
2- Manifestations pancréatiques.....	5
3- Manifestations hépatiques et biliaires.....	6
<b>3- Atteintes génitales .....</b>	<b>6</b>
<b>4- Atteintes d'autres organes.....</b>	<b>7</b>
<b>II- GÉNÉTIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE.....</b>	<b>10</b>
<b>1- Gène CFTR et transmission de la maladie.....</b>	<b>10</b>
<b>2- Les différentes classes de mutations.....</b>	<b>11</b>
<b>3- Corrélation entre génotype et phénotype .....</b>	<b>12</b>
<b>4- Hypothèses sur l'incidence actuelle de la mucoviscidose et la répartition géographique des mutations.....</b>	<b>13</b>
1- L'effet fondateur.....	14
2- L'avantage sélectif.....	17
<b>III- LA PROTÉINE CFTR.....</b>	<b>19</b>
<b>1- Localisation de CFTR.....</b>	<b>19</b>
1- Types cellulaires exprimant CFTR .....	19
2- Localisation subcellulaire .....	19
<b>2- Structure de la protéine CFTR.....</b>	<b>20</b>
<b>3- Relation entre la structure et la fonction de CFTR .....</b>	<b>23</b>
<b>4- Régulation de la fonction de CFTR.....</b>	<b>24</b>
1- Phosphorylation par la protéine kinase A .....	25
2- Phosphorylation par la protéine kinase C .....	27
3- Phosphorylation par la protéine kinase G .....	27
4- Autres kinases régulant l'activité de CFTR.....	28
5- Régulation de CFTR par les phosphatases.....	29
<b>5- Itinéraire cellulaire de CFTR : biosynthèse, maturation et dégradation .....</b>	<b>29</b>
1- Biosynthèse et maturation de CFTR .....	29
2- Adressage de CFTR .....	32
3- Recyclage endocytaire de CFTR.....	38
4- Dégradation de CFTR.....	40
5- La protéine mutée $\Delta F508$ .....	42
6- Structure fonctionnelle de CFTR : monomère ou dimère ?.....	45
<b>IV- FONCTIONS DE CFTR.....</b>	<b>48</b>
<b>1- CFTR est une protéine canal .....</b>	<b>48</b>
<b>2- CFTR est un régulateur d'autres protéines.....</b>	<b>49</b>
1- Le canal chlorure ORCC.....	49
2- L'échangeur $Cl^-/HCO_3^-$ .....	50
3- Le canal sodique ENaC.....	51

4- Les canaux potassiques ROMK .....	52
5- Les aquaporines .....	53
6- Les canaux chlorures calcium-dépendants.....	53
7- Les jonctions de type gap.....	53
8- Autres protéines régulées par CFTR.....	54
<b>3- Autres fonctions de CFTR.....</b>	<b>55</b>
1- Régulation du trafic vésiculaire et de la fusion des endosomes.....	55
2- Régulation du pH intracellulaire .....	55
3- Rôle dans l'infection/inflammation .....	56
<b>V- CFTR ET RÉGULATION <math>\beta</math>-ADRÉNERGIQUE.....</b>	<b>58</b>
<b>1- Les récepteurs <math>\beta_1</math> et <math>\beta_2</math>-adrénergiques.....</b>	<b>58</b>
1- Structure des gènes et des protéines $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques .....	58
2- Voies de signalisation $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques .....	59
3- Régulation de l'expression des récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques.....	61
4- Rôles physiologiques des récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques dans l'appareil respiratoire .....	64
<b>2- Le récepteur <math>\beta_3</math>-adrénergique .....</b>	<b>65</b>
1- Structure du gène .....	65
2- Structure de la protéine .....	67
3- Voies de signalisation .....	68
4- Régulation de l'expression du récepteur $\beta_3$ -adrénergique.....	71
5- Rôles physiologiques du récepteur $\beta_3$ -adrénergique.....	74
6- Régulation $\beta_3$ -adrénergique de CFTR .....	75
<b>VI- MUCOVISCIDOSE : APPROCHES THÉRAPEUTIQUES.....</b>	<b>77</b>
<b>1- La thérapie génique .....</b>	<b>77</b>
<b>2- La thérapie cellulaire .....</b>	<b>78</b>
1- Les cellules souches embryonnaires .....	78
2- Les cellules souches de la moelle osseuse .....	80
3- Les cellules souches progénitrices pulmonaires .....	82
<b>3- La pharmacothérapie .....</b>	<b>82</b>
1- Les chaperonnes chimiques .....	82
2- Les aminoglycosides .....	85
3- Les activateurs de CFTR.....	85
4- Les activateurs de protéines "alternatives" .....	92
<b>VII- OBJECTIFS.....</b>	<b>94</b>

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

<b>I- MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....</b>	<b>96</b>
<b>1- Lignées cellulaires .....</b>	<b>96</b>
<b>2- Les tissus bronchiques humains .....</b>	<b>98</b>
<b>II- TECHNIQUES DE TRANSFECTION CELLULAIRE .....</b>	<b>99</b>
<b>1- Les vecteurs d'expression .....</b>	<b>99</b>

2- La micro-injection intranucléaire .....	99
3- Transfection par vecteur synthétique .....	101
<b>III- BIOLOGIE MOLÉCULAIRE .....</b>	<b>102</b>
1- Préparation des ARN totaux.....	102
2- Réverse transcription et amplification par polymérisation en chaîne (RT-PCR) .	103
1- La réverse-transcription .....	103
2- Amplification par réaction en chaîne de polymérisation .....	103
3- RT-PCR quantitative en temps réel .....	105
<b>IV- ÉTUDE BIOCHIMIQUE.....</b>	<b>108</b>
1- Western blot .....	108
1- Préparation des extraits protéiques .....	108
2- Gels de protéines et analyse par immuno-empreinte .....	108
3- Quantification de l'expression protéique.....	109
2- Immunomarquage.....	110
1- Sur les lignées cellulaires.....	110
2- Sur les tissus bronchiques humains.....	110
<b>V- ÉTUDE FONCTIONNELLE : MICROCYTOFLUORIMÉTRIE.....</b>	<b>111</b>
1- Dispositif expérimental.....	111
2- Protocole expérimental.....	113
3- Analyse des résultats.....	116

## RÉSULTATS

<b>I- NHE-RF1 RESTAURE LA LOCALISATION ET LA FONCTION DE <math>\Delta F508</math>.....</b>	<b>117</b>
1- Introduction.....	117
2- Résultats et discussion .....	118
<b>II- EXPRESSION DES RÉCEPTEURS <math>\beta</math>-ADRÉNERGIQUES ET DE NHE-RF1 DANS LES POUMONS HUMAINS.....</b>	<b>120</b>
1- Introduction.....	120
2- Résultats.....	121
3- Discussion.....	131

<u>DISCUSSION - PERSPECTIVES.....</u>	135
---------------------------------------	-----

<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	145
---	-----

<u>ANNEXE.....</u>	188
--------------------	-----

# **INTRODUCTION**

## I- LA MUCOVISCIDOSE : PHYSIOPATHOLOGIE

Les premières descriptions médicales de la mucoviscidose remontent au Moyen-Age et faisaient état d'enfants amaigris avec un pancréas tuméfié et blanchâtre, et des diarrhées prolongées comme l'exposait le botaniste et anatomiste néerlandais Pieter Pauw en 1595. En 1606, Alonso y de los Ruyzes de Fonteca, médecin espagnol, écrivait que le goût salé qu'a le front de ces enfants malades indiquait qu'ils étaient possédés ou victimes de mauvais sorts, et que leur mort était proche. Mais il faut attendre le XX<sup>ème</sup> siècle pour avoir une description plus précise de la maladie avec le pédiatre suisse Guido Fanconi en 1936 qui lui donna le nom de « Zystische Pankreasfibromatose mit Bronchiektasien » (fibromatose kystique du pancréas avec bronchiectasie, Fanconi *et al.*, 1936). Ce nom a quelque peu persisté en France sous la terminologie de fibrose kystique du pancréas, mais surtout dans les pays anglo-saxons où la mucoviscidose est toujours appelée Cystic Fibrosis. En 1945, Farber introduisit le terme "mucoviscidosis" afin d'étendre la nomenclature jusqu'ici focalisée sur l'atteinte pancréatique. Il pensait que la maladie était en fait due à la présence généralisée dans différents organes de mucus visqueux et épais (Farber, 1945). En 1946, Andersen et Hodges apportèrent les premiers arguments en faveur d'une maladie génétique à transmission autosomique récessive (Andersen & Hodges, 1946). Deux ans plus tard, une vague de chaleur à New York multiplia le nombre d'hyperthermies parmi les patients mucoviscidosiques de l'Hôpital Columbia à cause d'une importante perte de sel et d'une mauvaise régulation de la température corporelle (Kessler & Andersen, 1951). Intéressé par ce phénomène, di Sant'Agnese qui travaillait aussi à Columbia chercha l'origine de la perte de sel qui accélérerait cette hyperthermie et décéla une composition modifiée en électrolytes dans la sueur de ces malades (di Sant'Agnese *et al.*, 1953). Ceci expliquait le "goût salé" des enfants dits ensorcelés dans la culture populaire médiévale. Cela permit, 5 ans après, de mettre au point le premier test de la sueur (Gibson & Cooke, 1959 ; pour revue : Quinton, 1999). Mais il a fallu attendre 1989 pour que Lap-Chee Tsui, Francis Collins et Jack Riordan identifient et isolent le gène responsable de la mucoviscidose. Ils le nomment Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (*CFTR*). La découverte est publiée en trois articles le 8 septembre 1989 dans la revue Science (Rommens *et al.*, 1989 ; Riordan *et al.*, 1989 ; Kerem *et al.*, 1989).

Depuis, de nombreuses études ont permis et permettent de comprendre les rôles physiologiques variés de la protéine CFTR et ses mécanismes de régulation afin d'améliorer

les connaissances sur la maladie, mieux prendre en charges les symptômes des patients et espérer trouver un jour un traitement efficace contre cette maladie complexe et multiforme.

La mucoviscidose, de part ses différents symptômes, peut être facilement confondue avec certaines maladies digestives ou bien respiratoires comme la bronchite, la pneumonie, l'asthme et les allergies. En effet, la mucoviscidose touche différents organes et différentes fonctions (Fig.1) mais selon les patients, les organes touchés et les symptômes seront différents. De plus, la sévérité est également liée au sexe puisque le risque de mortalité entre 1 et 20 ans est 1,6 fois plus élevé chez les jeunes filles que chez les garçons (Rosenfeld *et al.*, 1997). Après 20 ans, cette différence liée au sexe n'est plus significative. Tout cela complique la caractérisation de la pathologie.

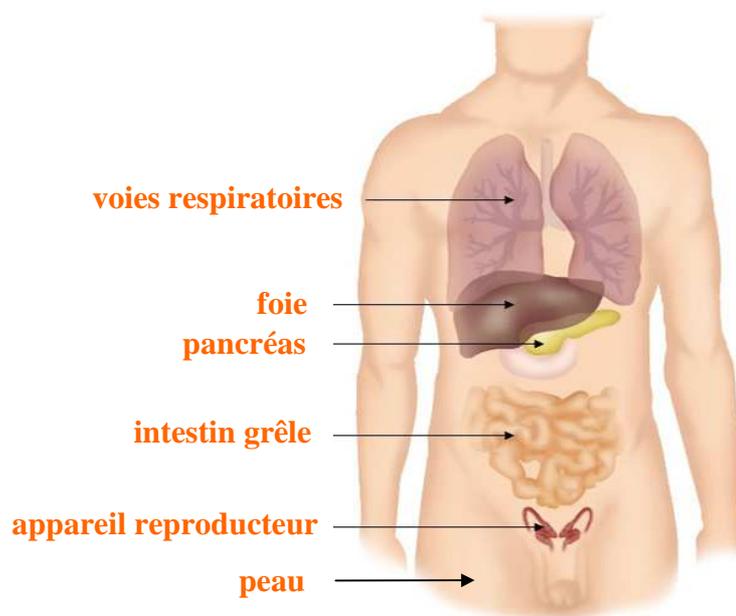


Figure 1. Les organes pouvant être affectés par la mucoviscidose (d'après [http://www.gsk.com.fr/gsk/votresante/mucoviscidose/mci\\_1.html](http://www.gsk.com.fr/gsk/votresante/mucoviscidose/mci_1.html)).

## 1- Atteintes respiratoires

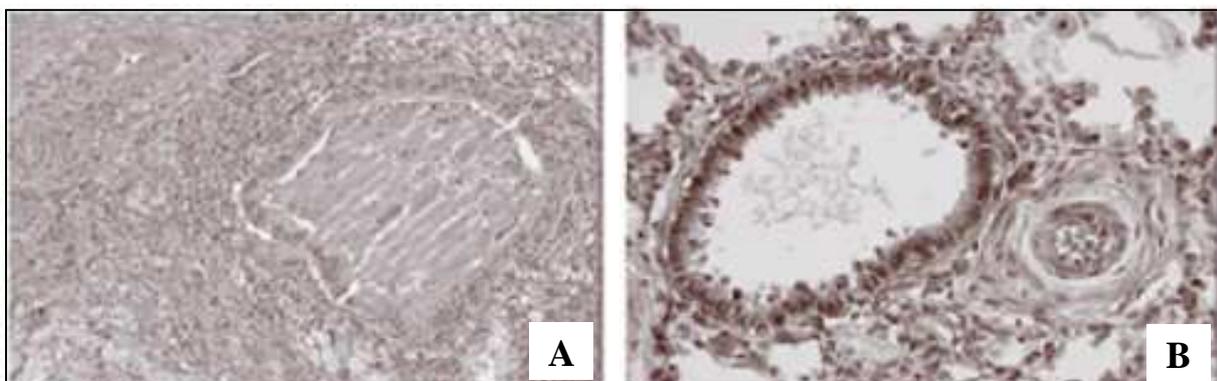
Les symptômes respiratoires sont la principale cause de morbidité et de mortalité. Cependant, les poumons de nouveau-nés atteints de mucoviscidose semblent normaux. Mais les premières manifestations apparaissent rapidement puisque les glandes sous-muqueuses s'encomrent de mucus dès les premiers mois (Ornoy *et al.*, 1987). Apparaissent aussi les premiers symptômes : toux chronique, production muqueuse importante et susceptibilité aux

infections bactériennes entraînant des bronchites à répétition. A la longue, le thorax de l'enfant se déforme (Fig.2). L'hyperplasie et l'occlusion des glandes sous-muqueuses sont des signes histologiques précoces de la maladie (Zuelzer & Newton, 1949 ; Oppenheimer & Esterly, 1975). Un défaut des glandes sous-muqueuses a été suspecté comme à l'origine de la mucoviscidose dès les années 40 (Zuelzer & Newton, 1949).



**Figure 2. Enfant atteint de mucoviscidose avec une distension thoracique et une maigreur flagrantes (source : Atlas de poche de génétique E. Passarge, Médecine-Sciences).**

Chez les sujets sains, le mucus recouvre les cellules bronchiques et protège le poumon des agressions de l'environnement (bactéries, virus, poussières, pollution,...). Chez les patients atteints de mucoviscidose, un défaut de transport hydroélectrique provoque une anomalie d'hydratation du mucus bronchique qui est visqueux, épais et responsable d'une clairance muco-ciliaire presque nulle (Knowles *et al.*, 1981, 1983 ; Quinton, 1983). Ce mucus mal évacué (Fig.3) devient alors le siège d'infections bronchiques chroniques et d'une inflammation importante. Cela va conduire à une insuffisance respiratoire par dégradation progressive de l'épithélium et l'appareil respiratoire en général.



**Figure 3. Coupe histologique d'une bronche obstruée d'un sujet atteint de mucoviscidose (A) comparée à une bronche d'un individu sain (B).**

Plusieurs pathogènes bactériens sont responsables des infections chroniques mais les principaux sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* et *Burkholderia cepacia*. Leur présence dans les poumons varie selon les patients et selon leur âge (Fig.4). *S. aureus* et *H. influenza* sont considérés comme des colonisateurs précoces qui faciliteraient l'attachement de *P. aeruginosa* et seraient ensuite remplacés par celui-ci (Lyczak *et al.*, 2002). D'ailleurs un motif polysaccharidique de la paroi de *P. aeruginosa*, le noyau du lipopolysaccharide (LPS), est un ligand pour l'ingestion par les cellules épithéliales saines permettant ainsi leur élimination (Pier *et al.*, 1996). Chez les patients mucoviscidosiques, les cellules épithéliales sont incapables d'ingérer ces bactéries. *P. aeruginosa* et les autres micro-organismes emprisonnés dans le mucus prolifèrent et produisent des toxines qui vont détruire les cellules de l'épithélium respiratoire. Ils sont également à l'origine d'une forte réponse inflammatoire, surtout lors des poussées de surinfection, avec un important infiltrat lymphocytaire. Ces lymphocytes, en particulier les polynucléaires neutrophiles, sécrètent des protéases et des dérivés réactifs de l'oxygène responsables de la destruction progressive de la matrice extracellulaire et des cellules (Delacourt, 2003). À cela s'ajoute encore le défaut de régénération de l'épithélium dont le processus est plus lent chez ces patients que chez les personnes saines (Hajj *et al.*, 2007), ainsi qu'une faculté pro-angiogénique intrinsèque des cellules épithéliales mucoviscidosiques qui augmente la sévérité des symptômes (Verhaeghe *et al.*, 2007). Le processus inflammatoire avec son infiltrat lymphocytaire participe à l'obstruction bronchique sans pour autant éliminer efficacement la cause bactérienne. S'en suit un cercle vicieux où infection et inflammation s'associent ou se succèdent. D'inflammatoires, les lésions deviennent irréversibles conduisant progressivement à la destruction des bronches et du parenchyme pulmonaire.

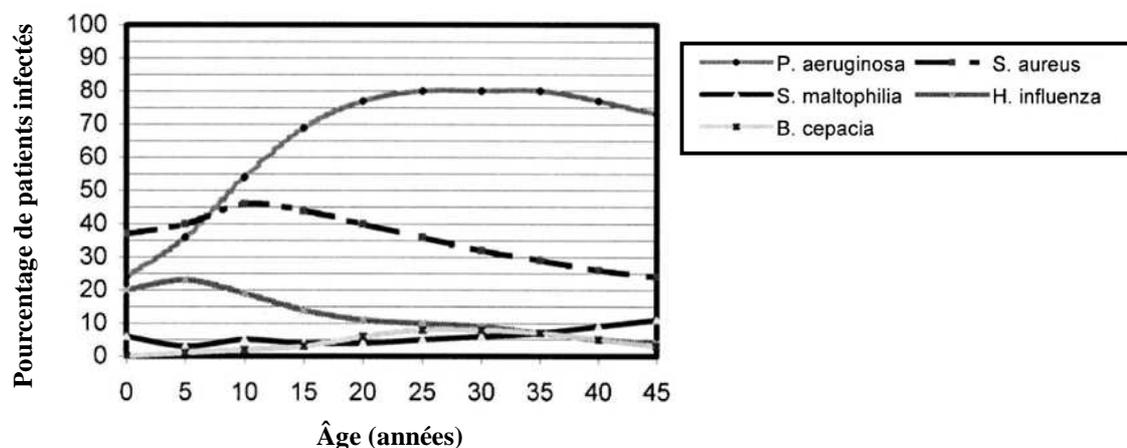


Figure 4. Colonisation bactérienne des poumons mucoviscidosiques selon l'âge du patient (d'après <http://www.medscape.com/content/2003/00/46/34/463496/art-copm463496.fig1.gif>)

## 2- Atteintes digestives

### 1- Manifestations gastro-intestinales

La manifestation la plus précoce de la mucoviscidose est l'iléus méconial, retrouvé dans environ 15% des cas. Il s'agit d'une occlusion intestinale par le méconium, premières selles du nouveau-né, normalement évacué quelques heures après la naissance.

Le syndrome d'obstruction intestinale distale (SOID) est l'équivalent d'un iléus méconial tardif. Il est observé chez environ 40% des patients dont 80% après 18 ans (Rosenstein *et al.*, 1983) et se traduit par des douleurs abdominales chroniques qui peuvent conduire à l'anorexie.

Le reflux gastro-oesophagien est retrouvé chez 25% des patients (Malfrout *et al.*, 1991). Il est principalement dû à une relaxation inappropriée du sphincter inférieur de l'œsophage, mais une augmentation du gradient de pression thoraco-abdominale peut également être en cause. Son rôle délétère sur la pathologie broncho-pulmonaire rend primordial sa prise en charge thérapeutique.

### 2- Manifestations pancréatiques

L'insuffisance pancréatique exocrine est la principale manifestation digestive de la mucoviscidose avec une prévalence de 87 % en France en 2003 (Observatoire National de la Mucoviscidose). Dès la vie anténatale, l'accumulation de bouchons muqueux dans les canaux pancréatiques aboutit à une obstruction du canal proximal et à des lésions du tissu pancréatique qui va jusqu'à la fibrose (Oppenheimer & Esterly, 1975), d'où le nom de fibrose kystique du pancréas donné par les Anglo-saxons. Cela se traduit par une absence de sécrétion des enzymes digestives pancréatiques pour conduire à une maldigestion des graisses et des protéines qui non traitée, entraîne une dénutrition, carence en vitamines liposolubles (vitamines A, E, D, K) et en acides gras essentiels. Une supplémentation nutritionnelle en extraits pancréatiques est donc nécessaire.

La fonction pancréatique est évaluée principalement par le biais des diarrhées graisseuses (stéatorrhées) associées à l'insuffisance pancréatique mais aussi par le dosage d'enzymes pancréatiques non dégradées dans les selles, en particulier l'élastase fécale. Plus simplement, les taux sanguins de trypsine ou de lipase sont effondrés, reflétant la fonction

pancréatique du patient. Lors de l'évolution de la maladie, un diabète insulino-dépendant peut apparaître lorsque la fibrose atteint les îlots de Langerhans.

Dans les formes de mucoviscidose modérée où la fonction pancréatique est conservée, la précipitation des sécrétions dans les canaux pancréatique peut cependant aboutir à des poussées répétées de pancréatite aiguë dans 1,8% des cas (De Boeck *et al.*, 2005).

### **3- Manifestations hépatiques et biliaires**

La protéine CFTR n'est pas retrouvée dans les hépatocytes mais elle est exprimée dans les canaux biliaires intra et extra-hépatiques (Cohn *et al.*, 1993). Chez les patients mucoviscidosiques, ces canaux peinent à évacuer la bile anormalement visqueuse (Oppenheimer & Esterly, 1975). La stagnation de cette bile va progressivement engendrer des lésions pour conduire à terme à une cirrhose hépatique appelée cirrhose biliaire focale qui s'accompagne d'une élévation plasmatique en vitamine B12 (Lindemans *et al.*, 1984). Du fait de l'allongement de la durée de vie des patients, elle est retrouvée chez 70% des adultes. Cette cirrhose peut évoluer dans 5 à 20% des cas vers une cirrhose multi-lobulaire avec développement d'une hypertension portale. C'est la seconde cause de mortalité avec 15% de décès chez les personnes atteintes de mucoviscidose.

### **3- Atteintes génitales**

La puberté est retardée aussi bien chez les garçons que chez les filles, principalement à cause des problèmes de nutrition.

Chez les hommes, une stérilité est observée dans 97% des cas suite à une obstruction, une atrophie voire une absence des canaux de l'épididyme et des canaux déférents (Kaplan *et al.*, 1968 ; Oppenheimer & Esterly, 1969). En revanche, les testicules sont normaux ainsi que la spermatogenèse. Néanmoins, une hypospermie ou une aspermie est souvent constatée (Holsclaw *et al.*, 1971). De plus, chez une population d'hommes en bonne santé mais hypofertiles ou infertiles, la fréquence de mutations de *CFTR* à l'état hétérozygote est plus élevée que dans la population générale (van der Ven *et al.*, 1996 ; Schulz *et al.*, 2006). Il a été récemment démontré que CFTR est exprimé dans les spermatozoïdes en cours de maturation (spermatides, spermatocytes) et matures ainsi que dans les canaux de l'épididyme, de la prostate, et dans l'épithélium de la vésicule séminale (Hihnal *et al.*, 2006). CFTR aurait un

rôle important dans le phénomène de capacitation, étape d'activation des spermatozoïdes, indispensable à la fécondation (Hernandez-Gonzalez *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2007). Par ailleurs, dans une autre maladie génétique rare, la diarrhée chlorée congénitale, due aussi à des défauts électrolytiques, une infertilité masculine est significativement plus fréquente que dans la population générale. Curieusement, chez ces patients la protéine CFTR n'est plus retrouvée dans les canaux de l'épididyme (Hihnala *et al.*, 2006).

Les femmes atteintes de mucoviscidose sont également hypofertiles. Elles n'ont pas d'anomalie morphologique mais elles manifestent une modification de la glaire cervicale. Celle-ci est épaissie et visqueuse (Oppenheimer *et al.*, 1970 ; Kopito *et al.*, 1973), et empêcherait ainsi les spermatozoïdes de franchir le col de l'utérus. En outre, la présence de CFTR a été démontrée dans l'utérus et son expression est régulée par les hormones sexuelles lors du cycle menstruel (Trezise *et al.*, 1993). L'expression de CFTR dans l'endomètre est augmentée par l'œstrogène (Rochwerger & Buchwald, 1993) et diminuée par la progestérone (Mularoni *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'inhibition de l'expression ou de l'activité de CFTR dans les cellules épithéliales de l'endomètre diminuent la capacitation des spermatozoïdes et donc diminuent les chances de fécondation (Wang *et al.*, 2003).

CFTR a donc un impact direct de façon précoce sur le développement du tractus génital masculin, puis plus tardivement sur la fertilité aussi bien masculine que féminine.

#### **4- Atteintes d'autres organes**

Les glandes sudoripares ont un rôle important dans la régulation thermique en contrôlant la sudation. Les glandes sudoripares sont au nombre de 1,5 million environ avec une répartition inégale, favorisant les pieds et le front. Chez le sujet sain, la sueur primaire est un liquide pauvre en protéines et dont la teneur en ions et la pression osmotique sont identiques à celles du plasma sanguin, mais suite à une réabsorption de sodium, de chlore, de bicarbonate et de lactate au niveau du canal excréteur, la sueur devient hypotonique au plasma. Chez le sujet atteint de mucoviscidose, la réabsorption des ions chlorures et sodiques est fortement diminuée si bien que le taux de sel dans la sueur est anormalement élevé. Cela est sans conséquence en conditions normales mais lors de fortes températures, la sudation importante provoque des pertes élevées d'eau et de sels et la régulation thermique est

également perturbée. Cela peut conduire à une hyperthermie susceptible de compromettre le pronostic vital si elle n'est pas prise en charge.

L'atteinte des voies aériennes supérieures est fréquente et se manifeste par des sinusites à répétition. Plus rarement des polypes nasaux peuvent survenir, responsables d'une sensation de nez bouché, de saignements de nez ou d'aggravation des signes de sinusite.

CFTR est exprimé dans diverses aires cérébrales, notamment dans l'hypothalamus où il régule la neurosécrétion de la gonadolibérine (Weyler *et al.*, 1999) qui elle-même stimule la libération de gonadotrophines au niveau de l'hypophyse. Les gonadotrophines (hormone lutéinisante LH et hormone folliculo stimulante FSH) stimulent la production des hormones sexuelles (testostérone et estradiol) afin de mettre en place les caractères sexuels secondaires lors de la puberté. Après la puberté, ces deux hormones permettent d'activer la spermatogenèse chez l'homme et de préparer l'utérus à la grossesse chez la femme. La dysfonction de CFTR dans la mucoviscidose perturbe cette voie de régulation, conduisant à l'apparition de certains symptômes tels que le retard de puberté et l'hypofertilité décrits précédemment.

Une atteinte cardiaque peut avoir lieu secondairement à l'insuffisance respiratoire. Ce symptôme prend la forme d'un cœur pulmonaire qui est une hypertrophie-dilatation du ventricule droit avec ou sans insuffisance cardiaque. L'insuffisance respiratoire peut en effet conduire à une hypoxie. Une vasoconstriction pulmonaire secondaire à cette hypoxie se met alors en place (Salvi, 1999) et va engendrer la dysfonction ventriculaire droite cardiaque. Les symptômes sont une dyspnée aiguë, un point de côté thoracique, une angoisse, des malaises allant parfois jusqu'à la syncope. Par ailleurs, les cardiomyocytes expriment CFTR (Levesque *et al.*, 1992 ; Nagel *et al.*, 1992). Mais des mutations dans le gène *CFTR* ne provoquent pas de symptômes cardiaques graves, même si des différences dans la régulation cardiaque sont observées, notamment une absence de réponse à la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique (Leblais *et al.*, 1999)..

Les patients mucoviscidosiques ont également une densité osseuse plus faible (Haworth *et al.*, 1999) et un risque de fracture 2 fois plus élevé (Aris *et al.*, 1998). Pendant les épisodes d'exacerbation infectieuse, le taux de cellules précurseurs des ostéoclastes est augmenté dans le sang. Ceci expliquerait la résorption osseuse exagérée chez ces patients, d'autant plus que

chez le sujet sain, CFTR est exprimé dans les différents sous-types de cellules osseuses que sont les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes (Shead *et al.*, 2006, 2007).

Au niveau de l'œil, la mucoviscidose entraîne parfois une kératoconjonctivite sèche avec une diminution du nombre de cellules caliciformes. Cette maladie ophtalmologique touche habituellement les personnes âgées. Il s'agit d'une sécheresse oculaire par insuffisance de sécrétion de larmes. Or, une diminution de la sécrétion lacrymale est décrite dans la mucoviscidose (Sheppard *et al.*, 1989 ; Castagna *et al.*, 2001).

CFTR est exprimé dans les lymphocytes B et T (Chen *et al.*, 1989 ; McDonald *et al.*, 1992). Il est impliqué notamment dans la production et la libération des cytokines et des anticorps (Moss *et al.*, 2000 ; Bubien, 2001). Ces processus étant diminués dans la mucoviscidose, ils contribuent certainement à l'inflammation excessive observée dans la pathologie.

## II- GÉNÉTIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE

### 1- Gène *CFTR* et transmission de la maladie

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente parmi les populations caucasiennes (Welsh *et al.*, 1995) : environ une naissance sur 3000 est affectée par cette pathologie. En revanche, les populations d'origine non caucasienne sont beaucoup moins affectées. En effet, cette fréquence est de l'ordre d'une naissance sur 15 000 chez les afro-américains (Hamosh *et al.*, 1998), et elle est encore plus faible chez les populations asiatiques avec par exemple 1 naissance sur 350 000 chez les japonais (Yamashiro *et al.*, 1997).

Le gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) a été localisé sur le chromosome 7 en 1985 et séquencé précisément en 1989 au niveau du locus chromosomique 7q31.2 (Knowlton *et al.*, 1985 ; Kerem *et al.*, 1989 ; Riordan *et al.*, 1989) (Fig.5). Ce gène de 189 kilobases (kb) contient 27 exons (Ellsworth *et al.*, 2000). Il est transcrit en un ARN messager (ARNm) de 6,5 kb dont la séquence codante de 4,4 kb est traduite en une protéine de 1480 acides aminés. Cette protéine est un canal chlorure situé à la membrane apicale des cellules de nombreux épithélia. A l'état hétérozygote, une mutation du gène *CFTR* est asymptomatique. Cela définit la notion de porteurs sains qui représentent 4 à 5% de la population. Par contre, deux parents porteurs sains ont 25 % de risque d'avoir un enfant malade, 25 % de chance d'avoir un enfant totalement sain et 50 % d'avoir un enfant porteur sain (Fig.6).

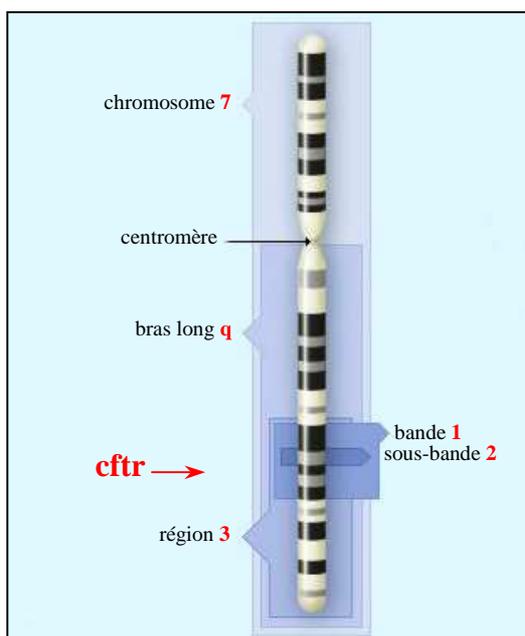


Figure 5. Localisation chromosomique de *CFTR* (d'après <http://ghr.nlm.nih.gov>).

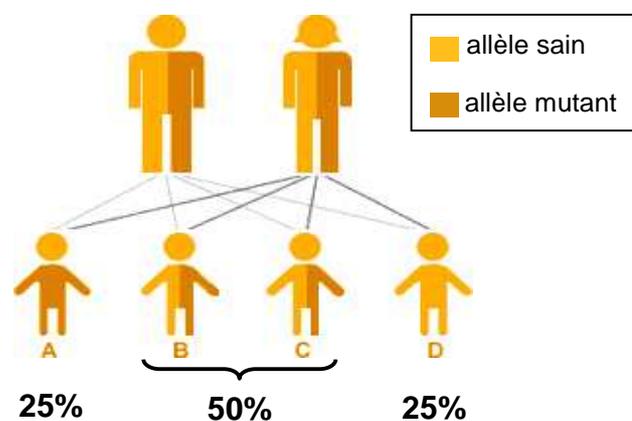


Figure 6. Schéma de la transmission génétique de la mucoviscidose.

## 2- Les différentes classes de mutations

Plus de 1500 mutations du gène *CFTR* sont aujourd'hui répertoriées (<http://genet.sickkids.on.ca/>), qui peuvent avoir différentes origines. Parmi ces 1500 mutations, on retrouve :

- 42 % de mutations faux-sens ;
- 15,5 % d'insertions ou délétions décalant le cadre de lecture ;
- 14,5 % sont des variations de séquence ;
- 12,5 % sont des mutations entraînant un défaut d'épissage ;
- 10 % de mutations non-sens (codon stop prématuré) ;
- 3 % de larges insertions/délétions ;
- 2 % d'insertions/délétions courtes et respectant le cadre de lecture ;
- 0,5 % de mutations du promoteur du gène *CFTR*.

Ces mutations peuvent entraîner une absence ou une dysfonction de la protéine CFTR à différents niveaux cellulaires, c'est pourquoi ces mutations sont réparties en 6 classes (Fig.7).

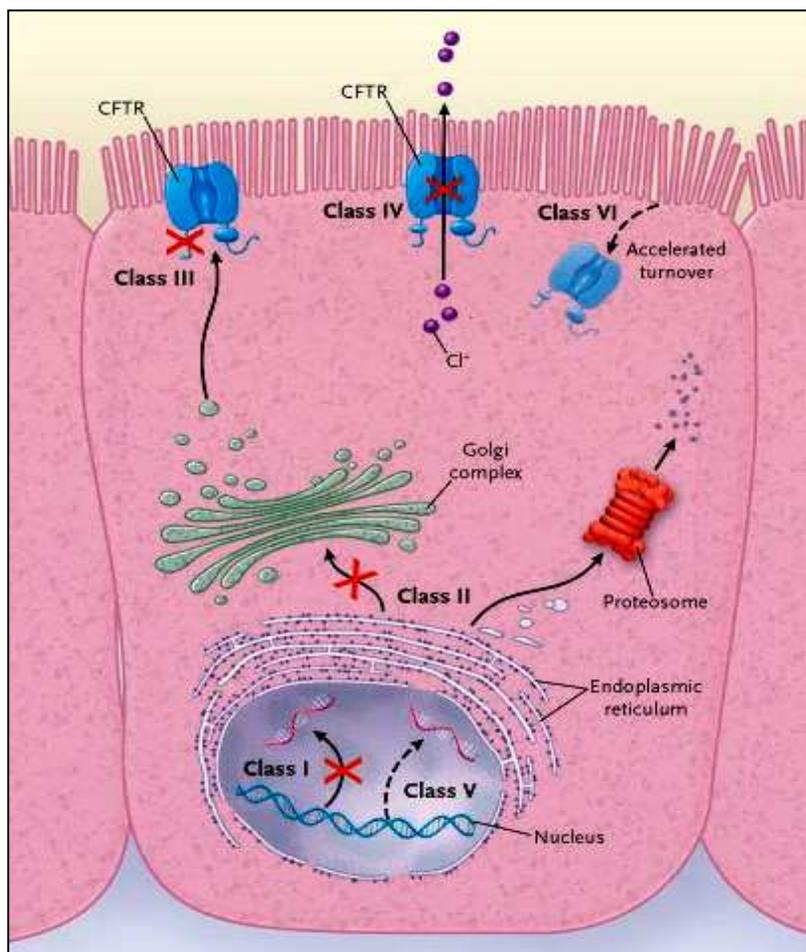


Figure 7. Schéma des différentes classes de mutations du gène *CFTR* et leurs conséquences sur la fonction de la protéine dans la cellule (d'après Rowe *et al.*, 2005).

La classe I regroupe les mutations responsables d'une inhibition de la production de CFTR. Cette classe regroupe les insertions ou délétions de nucléotides créant des sites d'épissage anormaux ou des codons stops prématurés par décalage du cadre de lecture. Il en résulte des ARNm non traduits ou des protéines tronquées qui sont rapidement dégradées. Exemple : les mutations G542X et R553X (Dork *et al.*, 1991 ; Hamosh *et al.*, 1992).

Les mutations de classe II perturbent le processus de maturation de la protéine. La protéine mutante n'est donc pas adressée à la membrane apicale des cellules. En général, elle reste localisée dans le cytoplasme. Exemple : la mutation  $\Delta F508$  (Denning *et al.*, 1992b).

Les protéines mutées de classe III sont présentes à la membrane apicale. Ces mutants sont correctement synthétisés et localisés mais présentent un défaut de régulation. Exemple : la mutation G551D (Yang *et al.*, 1993a).

La classe IV correspond à des mutants qui, comme dans la classe III, sont correctement adressés mais dont la conductance et/ou les probabilités d'ouverture et de fermeture du canal sont altérées. Ces mutations sont à l'origine des manifestations moins sévères de la maladie. Exemple : les mutations R117H, R334W et R347P (Sheppard *et al.*, 1993).

La classe V inclut des mutations dans le promoteur du gène et des mutations qui modifient l'épissage alternatif si bien qu'elles altèrent la quantité de protéines synthétisées. Exemple : la mutation 3849 + 10 kb C --> T qui est souvent associée à un phénotype modéré de la mucoviscidose (Highsmith *et al.*, 1994 ; Stern *et al.*, 1995).

La classe VI concerne les mutations pour lesquelles la protéine est correctement produite et adressée, mais dont la stabilité à la membrane est altérée (Haardt *et al.*, 1999).

### **3- Corrélation entre génotype et phénotype**

Sur le plan clinique, la relation génotype/phénotype est difficile à établir, due à la faible représentation de beaucoup de mutations et aux effets environnementaux modifiant le phénotype vrai. De plus, le phénotype peut être modulé par d'autres gènes susceptibles de compenser ou d'aggraver le tableau clinique. Ainsi, un même couple de mutations peut conduire à différents phénotypes (Clain *et al.*, 2005). Parmi des patients tous homozygotes

pour  $\Delta F508$ , ceux qui présentent un phénotype moins sévère ont également une activité chlorure résiduelle, et ceci n'est pas lié à une augmentation d'expression du mutant (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2002). Inversement, un même phénotype peut correspondre à des mutations et des désordres cellulaires différents (Fanen *et al.*, 1997). Même si le phénotype peut varier d'un patient à l'autre pour des mutations identiques, d'une manière générale la présence d'une mutation de classe I ou II sur chaque chromosome est associée à des symptômes respiratoires plus sévères et à une diminution de la durée de vie (de Gracia *et al.*, 2005).

#### 4- Hypothèses sur l'incidence actuelle de la mucoviscidose et la répartition géographique des mutations

La mutation la plus fréquente est une mutation de classe II caractérisée par une délétion d'un triplet de nucléotides dans l'exon 10, conduisant à l'absence d'une phénylalanine en position 508 de la protéine, d'où sa désignation sous le terme  $\Delta F508$  (Kerem *et al.*, 1989). La fréquence de la mutation  $\Delta F508$  par rapport à toutes les mutations de *CFTR* recensées dans la population varie entre 87 % en Europe du nord et 21 % au Moyen-Orient (Estivill *et al.*, 1997) (Fig.8), avec une moyenne mondiale de 66 % (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1994). La mutation  $\Delta F508$  représente même 100 % des mutations retrouvées sur les Îles Féroé (Schwartz *et al.*, 1995).

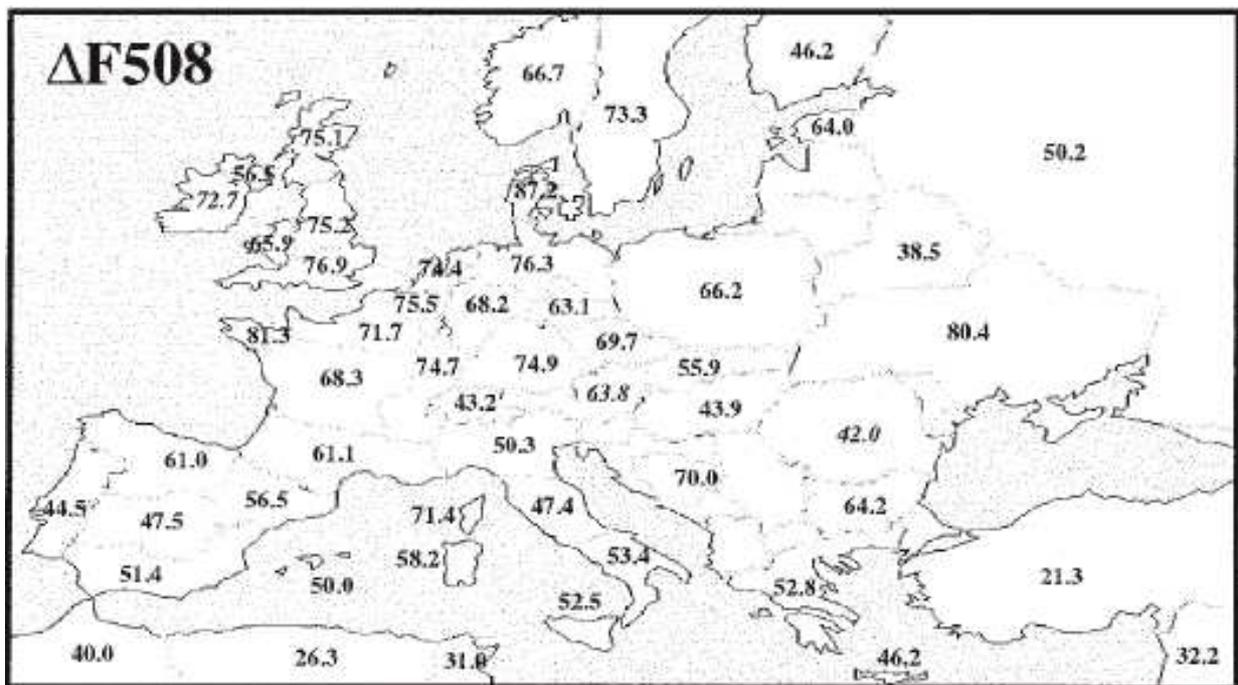
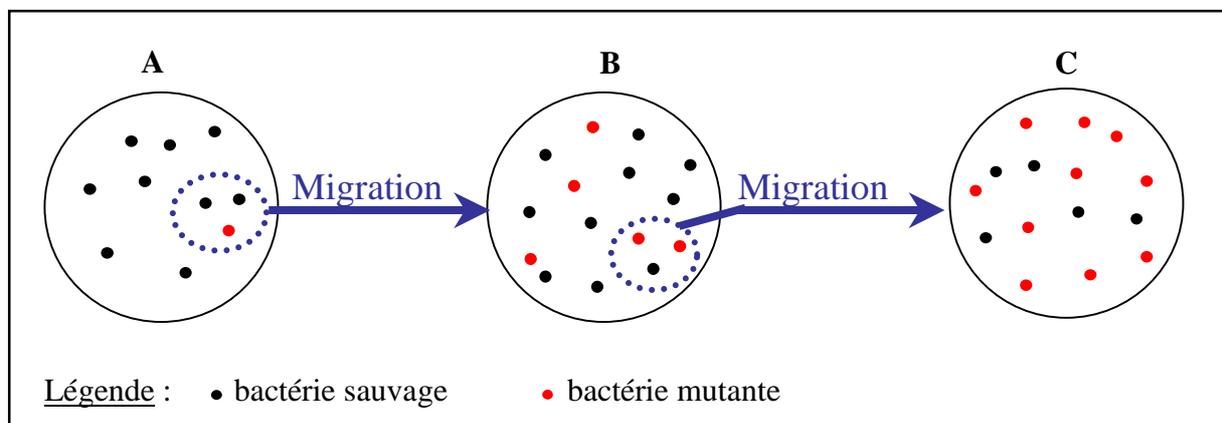


Figure 8. Carte géographique représentant la fréquence de la mutation  $\Delta F508$  par rapport à l'ensemble des mutations retrouvées en Europe et sur le pourtour méditerranéen (d'après Estivill *et al.*, 1997).

Comment expliquer qu'une maladie génétique telle que la mucoviscidose avec une mortalité importante puisse continuer d'exister et être relativement fréquente dans nos populations actuelles ? L'effet fondateur et l'avantage sélectif semblent être des éléments de réponse déterminants.

### 1- L'effet fondateur

L'effet fondateur se définit par une modification importante des fréquences alléliques dans une population nouvellement créée suite à la migration d'un petit groupe d'individus. Ce petit groupe d'individus se caractérise par la fréquence plus importante d'un allèle d'un gène particulier en comparaison à la population mère. La modification de fréquence est due au tirage aléatoire des migrants, et donc de leurs allèles, dans la population mère (Fig.9).



**Figure 9. Schéma illustrant l'effet fondateur sur une population bactérienne.**

(A) La population bactérienne mutante (rouge) représente 10% de la population totale. (B) Après migration d'une partie de la population, les bactéries mutantes représentent 33% de la population. (C) Un second événement migratoire entraîne la création d'une nouvelle population où les mutants représentent 66% des bactéries totales. Après chaque migration, les caractéristiques de la population nouvellement créée sont différentes de la population d'origine.

L'analyse du polymorphisme dans les régions microsatellites de chromosomes portant la mutation  $\Delta F508$  a révélé que cette mutation est apparue il y a 2625 générations, soit environ 52 000 ans (Morral *et al.*, 1994). La mutation aurait donc déjà été présente chez les premiers Hommes qui sont entrés en Europe au Paléolithique supérieur, il y a environ 40 000 ans. Ces Hommes venaient du continent asiatique apportant avec eux la mutation  $\Delta F508$ . Pourtant, les populations asiatiques sont très peu touchées par la mucoviscidose. Or, si la mutation est née en Asie, il est très improbable que tout ce peuple ait migré vers l'Europe, et on devrait en retrouver les traces encore aujourd'hui.

L'hypothèse la plus probable sur l'origine de la mutation  $\Delta F508$  repose sur l'histoire des populations du Baloutchistan. Le Baloutchistan est situé entre l'Iran (20%), le Pakistan (province du Baloutchistan 70%) et l'Afghanistan (10%) (Fig.10). Ses habitants, les Baloutches, sont au nombre de 5 millions. Le territoire baloutche originel se situait sur le Plateau iranien duquel ils ont migré entre les X<sup>ème</sup> et XIV<sup>ème</sup> siècle de notre ère pour s'installer sur leur territoire actuel. Cette région cernée de montagnes est décrite comme l'une des plus isolées au monde. Les mariages consanguins y étaient fréquents. Ceci explique que tous les patients d'origine baloutche sont homozygotes pour la mutation  $\Delta F508$  (Frossard *et al.*, 1998). De même, dans un screening de la population des Emirats Arabes Unis,  $\Delta F508$  est la seule mutation retrouvée chez les porteurs sains originaires du Baloutchistan. Cela est renforcé par une étude menée au sud de l'Iran, dans la province de Fars qui est adjacente au Baloutchistan mais ethniquement différente, qui montre qu'en 20 ans aucun cas de mucoviscidose n'y a été diagnostiqué. Sur 125 personnes ayant les symptômes de la mucoviscidose, seulement trois se sont vues confirmer le diagnostic par le test de la sueur (Karjoo *et al.*, 1984). Mais aucune étude génétique n'a été menée. En conclusion, la mucoviscidose est très rare dans une région proche du Baloutchistan alors qu'elle est diagnostiquée fréquemment chez les Baloutches. De façon similaire à la mutation  $\Delta F508$  aux Emirats Arabes Unis, des mutations de la  $\beta$ -thalassémie sont spécifiquement retrouvées chez les Baloutches (Quaife *et al.*, 1994).

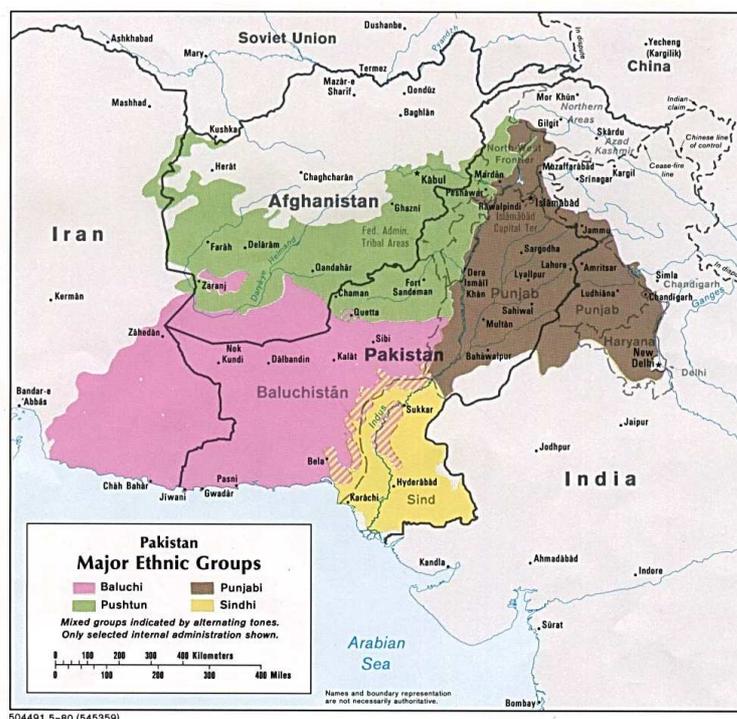


Figure 10. Carte géographique situant la région du Baloutchistan (en rose) entre l'Iran, le Pakistan et l'Afghanistan. (source [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Pakistan\\_ethnic\\_80.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Pakistan_ethnic_80.jpg))

L'hypothèse ici présentée suppose que la mutation  $\Delta F508$  serait apparue chez ces habitants du Plateau iranien et aurait voyagé jusqu'en Europe avec les premiers flux d'émigrants. Elle se serait ensuite répandue dans toute l'Europe, et en particulier vers le nord-ouest, par vagues migratoires successives (pour revue : Dawson & Frossard, 2000).

Un brassage génétique aurait ensuite eu lieu en Europe Centrale et au Moyen-Orient par des peuples émigrants de fonds génétiques différents apportant avec eux de nouvelles mutations, diluant ainsi la mutation  $\Delta F508$  (Morral *et al.*, 1994). Cela explique le gradient décroissant de fréquence de l'allèle  $\Delta F508$  du nord-ouest de l'Europe vers le sud-est. Par ailleurs, cette idée est renforcée par le fait que certaines communautés isolées géographiquement et/ou linguistiquement et culturellement n'ont pas ou peu subi cette dilution allélique, d'autant plus que la consanguinité était assez forte dans ces populations restreintes. C'est le cas des populations des Îles Féroé et de la communauté tzigane bulgare où la mutation  $\Delta F508$  est la seule retrouvée (Angelicheva *et al.*, 1997 ; Schwartz *et al.*, 1995) mais aussi chez les populations basque et bretonne chez lesquelles la mutation  $\Delta F508$  représente plus de 80 % des mutations totales (Casals *et al.*, 1992 ; De Braekeleer *et al.*, 1996). L'isolement génétique de la population basque est d'ailleurs prouvé de façon indirecte depuis les années 1960 : cette population possède le taux le plus faible d'Europe de groupe sanguin B et le taux le plus important au monde de groupe sanguin rhésus négatif (Goti-Iturriaga, 1966).

Une autre mutation de *CFTR*, G542X (mutation stop, de classe I), comptant pour 2,4 % des mutations totales (Kazazian *et al.*, 1994) est aussi un exemple intéressant d'effet fondateur. Cette mutation est très présente autour du bassin méditerranéen. Elle est particulièrement fréquente dans le sud de l'Italie et la Tunisie, elle représente 10 % des mutations dans le sud de l'Espagne et au Maroc, et même 16 % aux Îles Canaries (Estivill *et al.*, 1997). Cette mutation serait née en Phénicie (actuel Liban plus quelques territoires syrien, israélien et palestinien) et aurait fait le tour de la Méditerranée il y a 2500 à 3000 ans lors des voyages commerciaux phéniciens et de la mise en place de leurs comptoirs marchands (Loirat *et al.*, 1997).

## 2- L'avantage sélectif

L'hétérozygotie au niveau du gène *CFTR* a rapidement été suspectée comme facteur de résistance à certaines maladies et épidémies qui ont pu faire rage au cours de l'histoire de l'Homme (Anderson *et al.*, 1967). Cet avantage sélectif aurait permis d'augmenter au fil des siècles la proportion des porteurs sains.

Parmi les affections qui auraient contribué à la sélection des individus porteurs sains, les plus nommées sont le choléra, la fièvre typhoïde et la tuberculose.

Ainsi, les hétérozygotes *CFTR*, du fait de la dysfonction du mutant, verraient leur sécrétion de fluide diminuée lors d'une exposition à la toxine cholérique ou à l'entérotoxine de *Escherichia coli*. Ils seraient alors moins sujets aux épisodes diarrhéiques à l'origine du pronostic morbide de ces infections (Chao *et al.*, 1994 ; Cuthbert *et al.*, 1994 ; Gabriel *et al.*, 1994 ; Goldstein *et al.*, 1994 ; Rodman & Zamudio, 1991). Cependant, ces données sont contredites par deux études, l'une menée chez la souris, l'autre menée chez l'Homme. Ces études démontrent qu'il n'existe pas de différence de sécrétion d'ions chlorures entre les hétérozygotes porteurs sains et les homozygotes non porteurs de mutation de *CFTR*, suggérant qu'il n'y a pas de différence entre ces individus en terme de perte d'eau (Cuthbert *et al.*, 1995 ; Hogenauer *et al.*, 2000).

Par ailleurs, la survenue de la fièvre typhoïde nécessite la présence de la protéine CFTR à la membrane des cellules (Pier *et al.*, 1998). L'attachement de la bactérie responsable, *Salmonella typhi*, à la muqueuse intestinale serait donc diminué chez les porteurs sains car ceux-ci possèdent moins de protéines CFTR à la membrane de leurs cellules épithéliales, réduisant ainsi leur susceptibilité à la fièvre typhoïde (Pier *et al.*, 1998 ; Van de Vosse *et al.*, 2005).

Mais le choléra et la fièvre typhoïde sont des maladies des régions tropicales où la mucoviscidose est rare. Ces pathologies sont donc peu enclines à être à l'origine d'une sélection des porteurs sains en Europe.

L'implication de la tuberculose a également été étudiée dans la sélection naturelle des hétérozygotes chez qui une production accrue d'acide hyaluronique, composant essentiel des matrices extra-cellulaires, réduirait les contacts avec *Mycobacterium tuberculosis* (Meindl,

1987). Plus récemment, une déficience de l'enzyme arylsulfatase B a été observée chez les patients mucoviscidosiques. Le défaut de cet enzyme humaine nécessaire à la mise en place de la paroi de *Mycobacterium tuberculosis*, pourrait être responsable de la résistance à la tuberculose (Tobacman, 2003). En outre, une étude récente de Poolman et Galvani avance que la pandémie européenne de tuberculose du 17<sup>ème</sup> siècle présente les données historiques et géographiques nécessaires pour conduire à l'incidence actuelle de la mucoviscidose en Europe (Poolman & Galvani, 2006).

L'implication d'autres pathologies dans l'avantage sélectif des porteurs sains a également été évoquée : la grippe (Shier, 1979) et l'asthme (Schroeder *et al.*, 1995), mais ces hypothèses sont soumises à controverse (Mennie *et al.*, 1995).

### III- LA PROTÉINE CFTR

#### 1- Localisation de CFTR

##### 1- Types cellulaires exprimant CFTR

CFTR est exprimé dans divers organes et de nombreux types cellulaires. Une étude de la région promotrice du gène a révélé que *CFTR* est transcrit de manière constitutive dans les cellules d'origine épithéliale mais à un faible niveau (Yoshimura *et al.*, 1991a). Mais la similitude du promoteur de *CFTR* avec celui d'un gène de ménage a suggéré son expression dans des cellules non épithéliales comme les fibroblastes pulmonaires, les macrophages alvéolaires, les neutrophiles, les monocytes (Yoshimura *et al.*, 1991b).

Le niveau d'expression protéique de CFTR est variable selon les tissus. Ainsi, CFTR est exprimé fortement dans l'épithélium des conduits sudoripares, des conduits pancréatiques et des cryptes intestinales (Crawford *et al.*, 1991). Au niveau bronchique, l'expression protéique de CFTR est relativement faible. Elle est cependant plus importante dans les glandes sous-muqueuses que dans l'épithélium de surface (Engelhardt *et al.*, 1992). L'abondance de CFTR dans les glandes sous-muqueuses suggère un rôle majeur de celles-ci dans la pathogenèse de la mucoviscidose. Selon une autre étude, les cellules épithéliales nasales, trachéales et bronchiques contiennent chacune 1 à 2 copies d'ARNm du gène *CFTR* sauvage ou  $\Delta F508$  (Trapnell *et al.*, 1991). Mais CFTR est exprimé tout le long de l'arbre bronchique avec une variabilité topique et une variabilité entre patients (Engelhardt *et al.*, 1994). De plus, CFTR est essentiellement exprimé dans les cellules non ciliées (type Clara) (Engelhardt *et al.*, 1994).

L'expression de CFTR a aussi été étudiée ponctuellement dans des cellules de diverses origines : lymphocytes B et T (Chen *et al.*, 1989), cardiomyocytes (Levesque *et al.*, 1992 ; Nagel *et al.*, 1992), certains neurones centraux (Weyler *et al.*, 1999), cellules osseuses (Shead *et al.*, 2007), et cellules musculaires lisses (Robert *et al.*, 2004 ; Vandebrouck *et al.*, 2006).

##### 2- Localisation subcellulaire

Depuis la découverte du gène *CFTR* en 1989, la prévision structurale de la protéine CFTR augurait une localisation membranaire de la protéine. Mais il pouvait s'agir aussi bien de la membrane plasmique que d'une membrane d'un compartiment intracellulaire. Les premiers travaux d'immunolocalisation de CFTR ont été menés dans un système d'expression

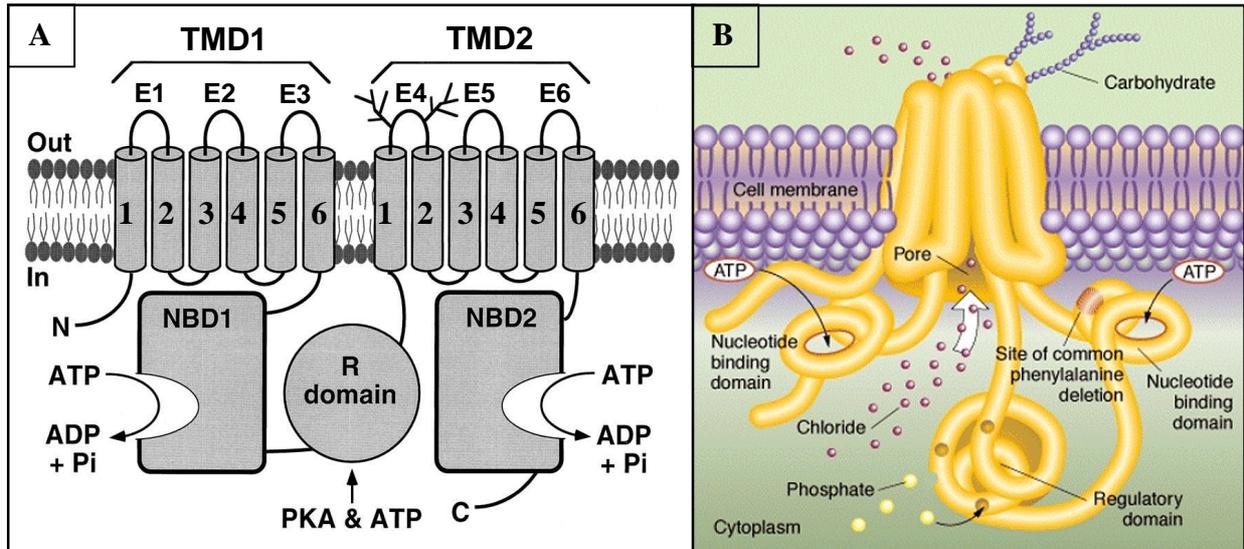
hétérologue montrant un marquage diffus de CFTR le long de la membrane plasmique des cellules COS-7 transfectées (Cheng *et al.*, 1990). D'autres études ont suivi, mettant en évidence une distribution membranaire apicale et sub-apicale ainsi que péri-nucléaire de CFTR (Dalemans *et al.*, 1992 ; Puchelle *et al.*, 1992).

Par ailleurs, certains auteurs ont cherché à identifier fonctionnellement CFTR dans des organites cellulaires comme les endosomes, les lysosomes ou le réticulum endoplasmique (RE) soit en réalisant des expériences de patch-clamp sur des fractions de membranes, soit en étudiant les variations de pH de ces organelles après activation ou inhibition de CFTR. Il a ainsi été démontré que CFTR est fonctionnellement présent dans le RE (Pasyk & Foskett, 1995), dans les endosomes (Lukacs *et al.*, 1992) et dans les lysosomes (Barasch *et al.*, 1991).

D'autres équipes ont utilisé une protéine CFTR chimérique porteuse d'un "tag" pour étudier la localisation intracellulaire de CFTR. Ainsi un épitope hémagglutinine ou FLAG (épitope de 8 acides aminés) ont été fixé sur une boucle extracellulaire, de même qu'une protéine verte fluorescente, la GFP (Green Fluorescent Protein), au niveau de l'extrémité C-terminale de CFTR. L'hémagglutinine altère la fonction de CFTR mais l'épitope FLAG permet de détecter l'expression membranaire apicale de CFTR (Howard *et al.*, 1995). De même, la GFP permet de localiser CFTR à la membrane apicale ainsi que dans des compartiments cellulaires (RE, appareil de Golgi) (Moyer *et al.*, 1998).

## **2- Structure de la protéine CFTR**

CFTR est une protéine de 1480 acides aminés dont la structure primaire a permis sa classification dans la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) (Ames *et al.*, 1990 ; Hyde *et al.*, 1990). Les transporteurs ABC sont subdivisés en sept sous-familles (ABCA à ABCG). CFTR étant le septième membre de la sous-famille C, il est aussi appelé ABCC7. Les transporteurs ABC utilisent l'énergie produite par l'hydrolyse d'ATP pour transporter activement divers substrats (acides aminés, sucres, antibiotiques, peptides, toxines) à travers la membrane cellulaire. La caractérisation de la séquence en acides aminés de CFTR en 1989 a permis de proposer un premier modèle pour la structure de la protéine (Riordan *et al.*, 1989), modèle ensuite complété par des études de mutations de CFTR (Fig.11).

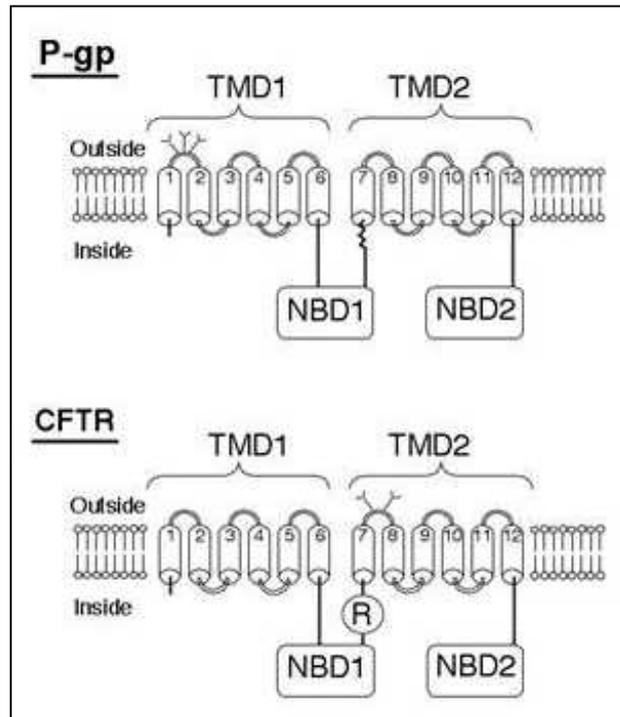


**Figure 11. (A) Modèle structural 2D proposé pour la protéine CFTR (d'après Sheppard & Welsh, 1999) et (B) modèle structural 3D (d'après <http://prometheus.mse.uiuc.edu/glossary/cf/>).**

CFTR comporte 2 régions de 6 segments transmembranaires (TMD1 et TMD2) reliés par 6 boucles extracellulaires (E1 à E6), ainsi que 2 domaines intracellulaires capables de lier l'ATP (NBD1 et NBD2) et un domaine cytosolique régulateur (R). La boucle extracellulaire E4 porte 2 chaînes glycosylées.

TMD : domaine transmembranaire ; NBD : domaine de liaison aux nucléotides ; R domain : domaine régulateur ; PKA : protéine kinase activée par l'AMPc ; ATP : adénosine tri-phosphate ; ADP : adénosine di-phosphate ; Pi : phosphate inorganique.

Comme tous les transporteurs de la famille ABC, CFTR possède deux régions TMD (Trans-Membrane Domain, aussi appelé MSD pour Membrane-Spanning Domain) qui forment le pore du canal et deux régions NBD (Nucleotide-Binding Domain) capables de lier et d'hydrolyser l'ATP pour réguler l'activité du canal (Anderson *et al.*, 1991a). Mais contrairement aux autres transporteurs ABC, CFTR possède en plus un domaine régulateur cytosolique R dont la phosphorylation contrôle l'activité du canal (Berger *et al.*, 1991 ; Tabcharani *et al.*, 1991) (Fig.11 et 12).



**Figure 12. Comparaison de structure entre CFTR et un autre transporteur ABC, le P-gp (d'après <http://biochemistry.utoronto.ca/clarke/bch.html>).**

Comme tous les transporteurs ABC, CFTR et P-gp présentent deux domaines transmembranaires (TMD = MSD) et deux domaines de liaison de l'ATP (NBD). CFTR a la particularité de posséder aussi un domaine régulateur R.

Dans la protéine CFTR, chaque TMD est constitué de 6 hélices  $\alpha$  constituant les segments transmembranaires (acides aminés 81 à 351 pour TMD1 et 860 à 1150 pour TMD2). Ce sont les TMD qui déterminent la sélectivité ionique de CFTR, en particulier les résidus lysine en position 95 et 335 (Anderson *et al.*, 1991b). Par ailleurs, les TMD portent les 6 boucles extracellulaires de CFTR (numérotées de E1 à E6) et la boucle E4, portée par TMD2, possède 2 sites de N-glycosylation en position 894 et 900 (Chang *et al.*, 1994) (Fig.11 et 12).

Les domaines intracytoplasmiques NBD1 et NBD2 fixent et hydrolysent l'ATP afin de fournir l'énergie nécessaire au transport ionique vectoriel à travers la membrane plasmique. Les deux domaines sont formés chacun de 160 acides aminés environ (résidus 422 à 550 pour NBD1 et 1219 à 1387 pour NBD2).

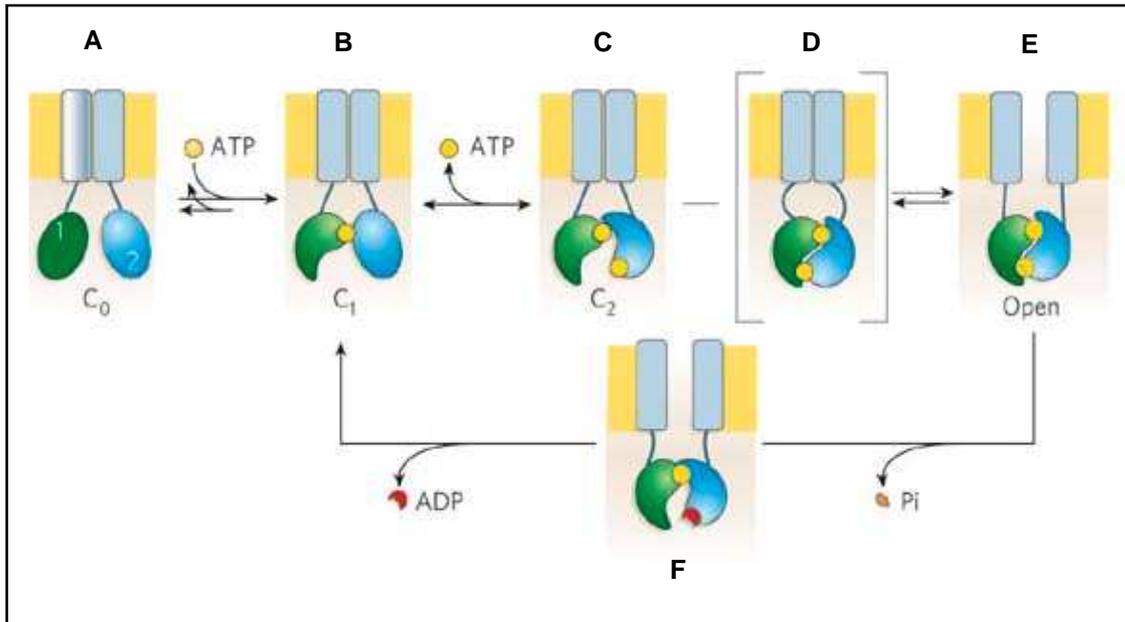
Le domaine régulateur R est codé par l'exon 13 du gène *CFTR* et s'étend des acides aminés 591 à 830. La comparaison de la séquence protéique du domaine R avec celles d'autres espèces a permis de le diviser en 2 sous-domaines (Dulhanty & Riordan, 1994) :

- RD1 (1<sup>st</sup> R Domain) correspond au tiers N-terminal du domaine R (résidus 591 à 672). Sa séquence est très conservée entre espèces (Dulhanty & Riordan, 1994). Il semble impliqué notamment dans la maturation de la protéine (Pasyk *et al.*, 1998).
- RD2 (2<sup>nd</sup> R Domain) correspond au deux tiers C-terminaux du domaine R (résidus 679 à 830). Cette région n'est pas retrouvée dans d'autres espèces ou d'autres protéines. RD2 contient presque tous les sites de phosphorylation du domaine R ce qui en fait un élément essentiel pour le fonctionnement de CFTR (Dulhanty & Riordan, 1994).

### **3- Relation entre la structure et la fonction de CFTR**

De nombreuses études démontrent l'importance des NBD dans le contrôle de l'activité du canal mais les mécanismes moléculaires restent encore assez flous et controversés. Cependant, il est généralement admis que les deux NBD n'ont pas le même rôle. Comme pour d'autres transporteurs de la sous-famille ABCC, seulement NBD2 a un pouvoir d'hydrolyse (Aleksandrov *et al.*, 2002).

Le processus d'ouverture du canal CFTR se déroule en plusieurs étapes. L'événement premier est la fixation d'ATP par NBD1 (Fig.13A et B) pendant plusieurs minutes durant lesquelles le canal CFTR connaît plusieurs cycles d'ouverture/fermeture comme décrit ci-après. La fixation d'ATP par NBD2 (Fig.13C) entraîne une étape lente d'ouverture du canal qui passe par un état de transition dans lequel NBD1 et NBD2 se joignent pour former un hétérodimère intramoléculaire (Fig.13D). Le pore du canal n'est toujours pas ouvert mais l'interaction des 2 NBD permet l'ouverture stable de CFTR (Fig.13E). Cet état stable ouvert est déstabilisé lorsque l'ATP fixé au NBD2 est hydrolysé. La perte du phosphate inorganique suite à cette hydrolyse, provoque la rupture de l'interaction NBD1/NBD2 (Fig.13F), la fermeture du canal et un retour en début de cycle (Fig.13B) (Gadsby *et al.*, 2006).



**Figure 13. Modèle structural proposé pour illustrer les mécanismes d'ouverture et fermeture ATP-dépendants du canal CFTR phosphorylé (d'après Gadsby *et al.*, 2006).**

NBD1 est en vert, NBD2 est en bleu. Le domaine cytosolique R est volontairement omis.

**A** : protéine CFTR au repos ; **B** : fixation d'ATP par NBD1 ; **C** : fixation d'ATP par NBD2 ; **D** : formation d'un dimère intramolécule NBD1/NBD2 ; **E** : état stable ouvert ; **F** : rupture de l'interaction NBD1/NBD2 suite à l'hydrolyse d'ATP par NBD2 et au relargage du phosphate inorganique, entraînant la fermeture du canal CFTR (retour à l'état décrit en b).

## 4- Régulation de la fonction de CFTR

Le modèle du cycle ouverture/fermeture de CFTR proposé en figure 13 est valide à condition que le domaine régulateur cytosolique soit phosphorylé. Ce domaine R possède 16 sites consensus de phosphorylation par la PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPc), la PKG (protéine kinase dépendante du GMPc), la PKC, des tyrosines kinases ou la Cam Kinase I (kinase dépendante de la calmoduline et du calcium) (Riordan *et al.*, 1989 ; Picciotto *et al.*, 1992) (Fig.14). Parmi les 16 sites théoriques de phosphorylations, certains ne sont pas phosphorylés *in vitro* et encore moins le sont *in vivo* (Cheng *et al.*, 1991 ; Picciotto *et al.*, 1992 ; Chang *et al.*, 1993).

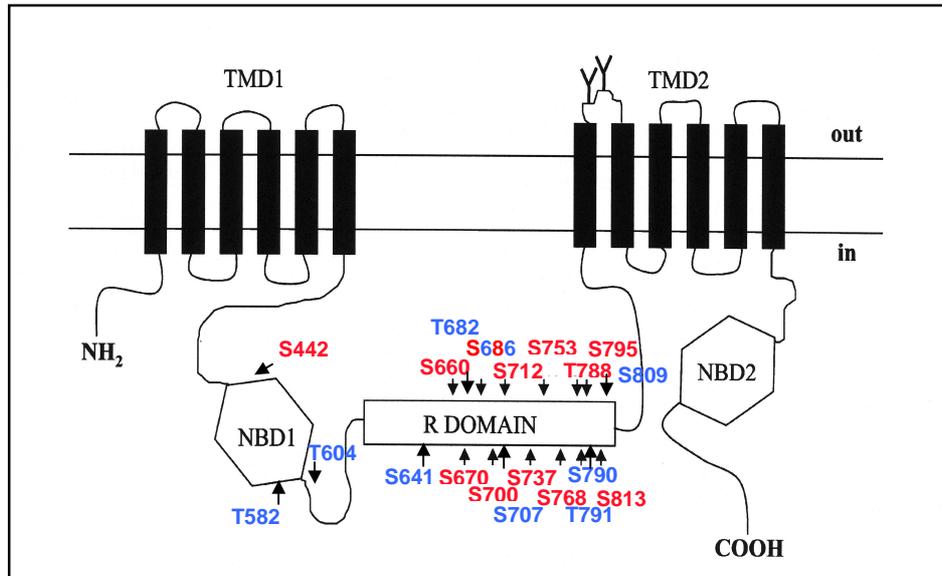
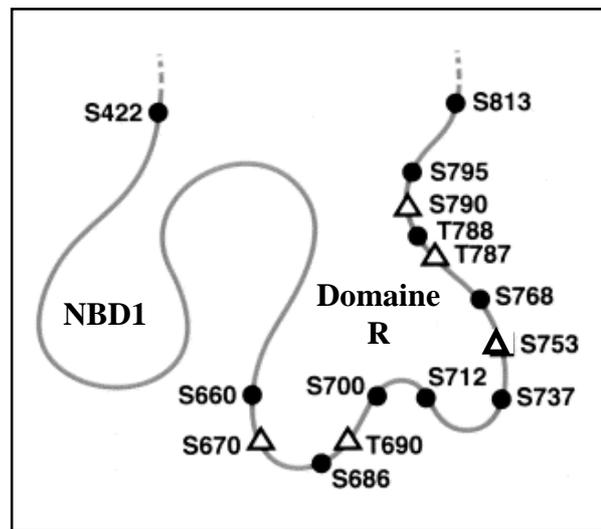


Figure 14. Les sites de phosphorylation de la protéine CFTR par la PKA (en rouge) et par la PKC (en bleu) (modifié d'après Vankeerberghen *et al.*, 2002).

### 1- Phosphorylation par la protéine kinase A

La protéine kinase A (PKA) est une sérine/thréonine kinase activée par l'AMPc. C'est le principal activateur cellulaire de CFTR, connu pour posséder 11 sites consensus de phosphorylations par cette enzyme. Parmi ces 11 sites, 10 sont des motifs consensus dibasiques (R/K, R/K, X, S/T) et 1 est un motif monobasique (R/K, X, S/T). La mutation de sérines phosphorylables du domaine R a révélé une diminution mais pas de suppression de la réponse à la PKA (Cheng *et al.*, 1991). Même lorsque toutes ces sérines sont remplacées par mutagenèse, une activation par la PKA subsiste (Chang *et al.*, 1993). Aucune sérine individuellement n'est donc indispensable à la régulation de CFTR. Mais toutes les sérines phosphorylables n'ont pas la même influence sur la fonction de CFTR. Ainsi la phosphorylation des sérines situées sur le domaine R en position 660, 670, 700, 795 et 813 stimule la fonction du canal, alors que la phosphorylation des sérines 737 et 768 a un effet inhibiteur (Wilkinson *et al.*, 1997). Une protéine CFTR totalement insensible à la PKA a finalement été obtenue par mutation des 11 sites connus de phosphorylation par la PKA ainsi que 4 sites supplémentaires monobasiques (Seibert *et al.*, 1999) (Fig 15).



**Figure 15.** Représentation schématique des 15 sites de phosphorylation de CFTR par la PKA (d'après Seibert *et al.*, 1999).

● motif dibasique      ▲ motif monobasique

Par ailleurs, la suppression totale du domaine R conduit à une protéine CFTR constitutivement active, prouvant le rôle inhibiteur intrinsèque de ce domaine (Rich *et al.*, 1991). Par la suite est né un modèle structural selon lequel le domaine R formerait une boule bloquant le pore du canal. Sa phosphorylation entraînerait un changement conformationnel qui libérerait le pore du canal permettant ensuite la régulation des cycles d'ouverture/fermeture par l'ATP sur les NBD. Ce changement conformationnel provoqué par la ou les phosphorylations serait de nature électrostatique (Rich *et al.*, 1993). Certains auteurs suggèrent aussi que la phosphorylation par la PKA augmente l'affinité de CFTR pour l'ATP facilitant ainsi indirectement son activité d'hydrolyse de l'ATP (Li *et al.*, 1996b ; Vais *et al.*, 2004). Récemment, une étude démontre qu'à l'état non phosphorylé, le domaine R a une structure formée de multiples hélices qui interagissent avec NBD1. La phosphorylation modifie la structure du domaine R en diminuant le nombre d'hélices. Cela réduit les interactions avec NBD1, le laissant libre pour interagir avec NBD2 et ainsi permettre l'ouverture du canal (Baker *et al.*, 2007). Cette interaction entre domaine R et NBD1 est réciproque puisque la mutation  $\Delta F508$  située dans le NBD1 réduit la phosphorylation du domaine R par la PKA, expliquant ainsi, en partie, les défauts d'activité qui ont été décrites pour ce mutant (Wang F *et al.*, 2000).

Bien que la PKA joue un rôle prédominant dans l'activation de CFTR, d'autres kinases interviennent dans la régulation fonctionnelle de CFTR, ce qui suggère qu'il existe différentes voies d'activation de CFTR et différents degrés dans la réponse lors de l'ouverture du canal.

## **2- Phosphorylation par la protéine kinase C**

La protéine kinase C (PKC) est une sérine/thréonine kinase activée par les ions calciques et le diacylglycérol. Elle a d'abord été décrite comme régulateur de l'activité de CFTR en phosphorylant les résidus sérines 686 et 790 (Picciotto *et al.*, 1992). Mais l'abolition par mutagenèse dirigée de ces 2 sérines diminue la régulation par la PKC sans l'abolir, suggérant d'autres sites de phosphorylation (Yamazaki *et al.*, 1999). En effet, 9 sites consensus de phosphorylation par la PKC sont retrouvés sur CFTR dans la partie distale de NBD1 et dans le domaine R (Fig.14). La mutation de ces 9 sites abolit l'effet de la PKC (Chappe *et al.*, 2003). Une investigation plus précise a permis de déterminer que les acides aminés thréonine en position 582 et 604, et sérine en position 686 sont les résidus essentiels à la régulation de CFTR par la PKC (Chappe *et al.*, 2004).

La phosphorylation par la PKC seule ne modifie pas ou peu l'activité chlorure de CFTR, par contre, elle potentialise l'activation de CFTR par la PKA (Winpenny *et al.*, 1995). En effet, l'activation de CFTR successivement par la PKC et la PKA conduit à un état de phosphorylation supérieur à celui observé lors de l'activation de CFTR par la PKA seule ou la PKC seule (Tabcharani *et al.*, 1991). Par ailleurs, l'activation de CFTR par la PKA semble nécessiter une phosphorylation constitutive par la PKC, sans quoi la PKA n'a aucun effet (Jia *et al.*, 1997a). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation par une kinase influence l'accessibilité et la capacité de phosphorylation de CFTR par les autres kinases.

## **3- Phosphorylation par la protéine kinase G**

La protéine kinase G (PKG ou cGK pour cGMP-dependent protein kinase) est également une sérine/thréonine kinase. Son pouvoir phosphorylant est contrôlé par le taux de GMPc intracellulaire. La PKG est capable de phosphoryler CFTR au niveau des sérines 660, 700, 737, 768, 795 et 813 (Picciotto *et al.*, 1992). Les deux isoformes, PKG I et PKG II, sont capables de phosphoryler le domaine R de CFTR *in vitro*, mais seul PKG II est capable de stimuler l'activité de CFTR dans les cellules (French *et al.*, 1995 ; Vaandrager *et al.*, 1997). Cette faculté de PKG II provient de son ancrage à la membrane par un groupement myristate

fixé à son extrémité N-terminale (Vaandrager *et al.*, 1996 ; Vaandrager *et al.*, 1998). En effet, l'isoforme PKG I dont une mutation permet la myristoylation en N-terminal possède les mêmes capacités de régulation que PKG II (Vaandrager *et al.*, 1998).

#### **4- Autres kinases régulant l'activité de CFTR**

Les protéines G trimériques activées par le GTP sont également capables de moduler l'activité de CFTR. Elles ont un impact négatif sur l'activité de CFTR dans les cellules épithéliales respiratoires (Schwiebert *et al.*, 1992) alors qu'elles stimulent CFTR dans les glandes sudoripares (Reddy *et al.*, 2001 ; Reddy & Quinton, 2001).

Les kinases activées par l'AMP (AMPK) sont des sérine/thréonine kinases liées directement à CFTR. Les AMPK sont des protéines hétérotrimériques constituées de trois sous-unité  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les isoformes AMPK- $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 se fixent à un motif situé du côté C-terminal de CFTR et localisé au niveau du domaine NBD2 pour AMPK- $\alpha$ 1 (Hallows *et al.*, 2000 ; Crawford *et al.*, 2006). Les isoformes AMPK- $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2 sont capables de se fixer sur le domaine NBD1 (Crawford *et al.*, 2006). L'activation des AMPK inhibe CFTR (Hallows *et al.*, 2000). Mais les AMPK se lient également aux nucléosides diphosphates kinases (NDPK) dont le rôle est de régénérer les nucléosides diphosphates en nucléosides triphosphates. Les NDPK sont également douées d'une activité kinase. L'isoforme NDPK-A est capable de lier le domaine R de CFTR d'une part, et de fixer les AMPK- $\alpha$ 1 et  $\gamma$ 2 d'autre part (mais pas  $\alpha$ 2, ni  $\gamma$ 1), permettant ainsi de spécifier les isoformes trimériques d'AMPK qui régulent CFTR (Crawford *et al.*, 2006).

En plus des régulations par les sérine/thréonine kinases, CFTR peut être régulé par des tyrosine kinases (Illek *et al.*, 1995). Ainsi, la tyrosine kinase p60-src est capable de stimuler l'activité de CFTR (Fischer & Machen, 1996). Une tyrosine phosphorylée peut d'ailleurs être détectée sur CFTR (Jia *et al.*, 1997b). Pourtant, la génistéine, inhibiteur de tyrosine kinases, augmente fortement l'activité de CFTR (Illek *et al.*, 1995). Mais l'action de la génistéine ne semble pas liée à ses propriétés enzymatiques inhibitrices des tyrosine kinases, mais plutôt à une action directe sur deux sites distincts de CFTR ayant des effets opposés : un site de haute affinité qui diminue la probabilité de fermeture du canal, et un site de faible affinité qui réduit sa probabilité d'ouverture (Wang F *et al.*, 1998). Par ailleurs, dans les lymphocytes normaux, la conductance chlorure est augmentée pendant la phase G1 du cycle cellulaire, suggérant une

sur-expression de CFTR pendant cette phase ou une stimulation de CFTR par les kinases dépendantes du cycle cellulaire. Par contre, ce processus n'est pas observé chez les patients mucoviscidosiques (Bubien *et al.*, 1990).

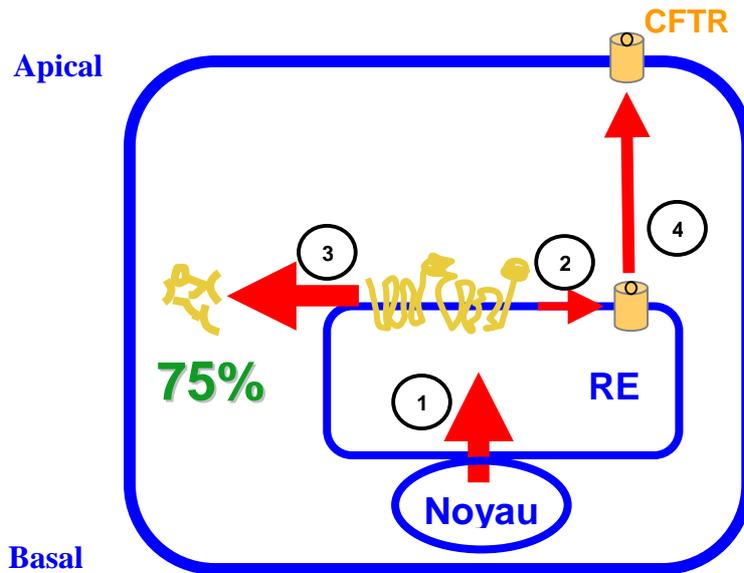
### **5- Régulation de CFTR par les phosphatases**

Si l'activité de CFTR est généralement stimulée par des kinases, elle est aussi inhibée par des phosphatases (Tabcharani *et al.*, 1991 ; Becq *et al.*, 1993 ; Becq *et al.*, 1994). Les protéines phosphatases sérine/thréonine sont une grande famille : PP1, PP2A, PP2B, PP2C, PP3, PP4, PP5, PP6 et PP7 (Cohen, 1989). Les phosphatases PP2A et PP2C sont les deux enzymes principalement impliquées dans la désactivation de CFTR (Berger *et al.*, 1993 ; Travis *et al.*, 1997). D'ailleurs CFTR et PP2C, mais pas les autres phosphatases, sont associés dans un complexe stable (Zhu *et al.*, 1999). La phosphatase alcaline serait également impliquée dans la désactivation de CFTR (Becq *et al.*, 1993) malgré une controverse (Berger *et al.*, 1993). Mais l'exposition simultanée de cellules aux phosphatases PP2A, PP2C et à la phosphatase alcaline réduit l'activité du canal de 90% mais ne l'abolit pas, indiquant que CFTR est régulé par d'autres phosphatases dont peut-être PP2B (Fischer *et al.*, 1998 ; Luo *et al.*, 1998). En outre, la régulation physiologique de CFTR par la phosphatase alcaline pourrait sembler peu probable car, même si elle est localisée à la membrane apicale des cellules, son activité enzymatique est orientée vers le milieu extracellulaire (Becq *et al.*, 1993). Cependant, il existe des phosphatases alcalines localisées à la membrane apicale et dont l'activité enzymatique est cytosolique (Tokumitsu *et al.*, 1981).

## **5- Itinéraire cellulaire de CFTR : biosynthèse, maturation et dégradation**

### **1- Biosynthèse et maturation de CFTR**

La biosynthèse de CFTR est un processus complexe et peu efficace : environ 75% des protéines CFTR sauvages néo-synthétisées dans une cellule sont dégradées au niveau du RE par le protéasome. Par conséquent, seulement 25% des protéines CFTR synthétisées parviennent à la membrane plasmique (Lukacs *et al.*, 1994 ; Ward & Kopito, 1994) (Fig.16).

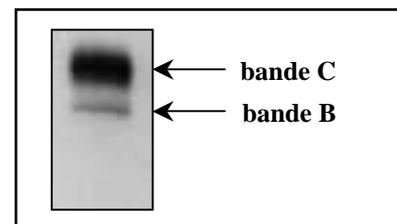


**Figure 16. Schéma de la voie de synthèse et de dégradation de CFTR dans une cellule épithéliale (modifié d'après Gelman & Kopito, 2002).**

- |  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| ① Transcription, traduction et intégration à la membrane du RE | ③ Dégradation par le protéasome     |
| ② Maturation conformationnelle                                 | ④ Adressage à la membrane plasmique |

Les glycosylations sur la boucle extracellulaire E4 de la protéine témoignent de l'état de maturation de CFTR (Cheng *et al.*, 1990). Trois formes de CFTR sont distinguées en fonction de leur poids moléculaire après migration sur gel SDS-PAGE :

- La bande A d'une taille de 127 kDa, correspond à la protéine "nue" nouvellement synthétisée et donc non glycosylée. Cette bande n'est généralement pas détectée.
- La bande B d'une taille de 150 kDa, correspond à la forme partiellement glycosylée dans le RE et sensible à l'endoglycosidase H (Fig.17).
- La bande C d'une taille de 170-190 kDa, correspondant à la forme mature totalement glycosylée dans l'appareil de golgi et résistante à l'endoglycosidase H. Seule cette forme est présente à la membrane plasmique (Fig.17).



**Figure 17. Illustration des bandes B et C de CFTR mises en évidence par Western blot (d'après Loo *et al.*, 1998)**

Les chaînes oligosaccharidiques de CFTR joueraient un rôle dans la stabilité de la protéine à la membrane (Lukacs *et al.*, 1993).

CFTR est d'abord synthétisé au niveau du RE granuleux sous forme immature non glycosylée (bande A). Immédiatement viennent se greffer 2 chaînes oligosaccharidiques riches en mannose et sensibles à l'endoglycosidase H (bande B). La suite de la maturation n'a lieu que si la conformation générale de la protéine est correcte. Pour vérifier et faciliter la bonne conformation structurale de la protéine, des protéines chaperonnes interagissent avec CFTR. Les chaperonnes décrites comme impliquées dans la maturation de CFTR sont Hsc70/Hsp70 (Heat shock cognate protein, Heat shock protein) (Yang *et al.*, 1993b), Hsp90 (Loo *et al.*, 1998) et la calnexine (Pind *et al.*, 1994) (Fig.18).

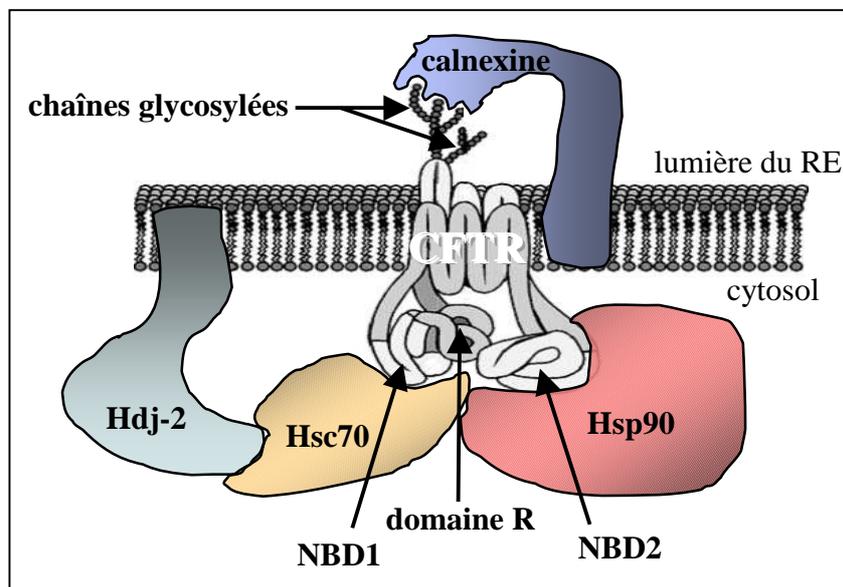


Figure 18. Représentation schématique de CFTR et de ses protéines chaperonnes.

CFTR est pris en charge par les protéines chaperonnes avant même la fin de sa protéosynthèse. En effet, sur la face cytosolique du RE, Hsc70 (forme constitutive, Hsp70 étant la forme inductible) et sa co-chaperonne Hdj-2 interagissent avec le domaine NBD1 naissant, puis cette interaction est interrompue lorsque le domaine R est synthétisé (Strickland *et al.*, 1997 ; Meacham *et al.*, 1999). Cette interaction transitoire faciliterait les premières étapes de l'assemblage de CFTR dans le RE.

De même, Hsp90 semble stabiliser la protéine CFTR néo-synthétisée car son inhibition entraîne une dégradation prématurée de CFTR (Loo *et al.*, 1998). En fait, il semblerait que la protéine CFTR native, non conformée soit prise en charge par le complexe chaperonne Hsc70 puis transférée vers le complexe Hsp90 lorsqu'elle acquiert une structure provisoire correcte (Wegele *et al.*, 2006).

Du côté luminal du RE, agit une lectine transmembranaire, la calnexine. Cette protéine capable de reconnaître des motifs oligosaccharidiques retient dans le RE les protéines CFTR mal conformées (Pind *et al.*, 1994). La protéine sauvage est en effet retenue dans le RE par la calnexine tout en étant préservée de la dégradation lorsque certaines enzymes de glycosylation de CFTR sont inhibées (Farhina & Amaral, 2005).

Les protéines CFTR correctement conformées migrent vers le compartiment intermédiaire RE/Golgi (ERGIC) dans des vésicules COPII antérogrades (Bednarek *et al.*, 1995). Dans le ERGIC, les protéines sont soit recyclées vers le RE *via* des vésicules COPI rétrogrades, soit transportées vers l'appareil de Golgi *via* d'autres vésicules antérogrades pour poursuivre leur maturation. Dans l'appareil de Golgi, CFTR subit les dernières modifications de ses motifs saccharidiques, ce qui le rend résistant à la digestion par l'endoglycosidase H. Il est ensuite adressé par transport vésiculaire aux endosomes puis à la membrane plasmique apicale.

## 2- Adressage de CFTR

Des protéines autres que les chaperonnes interagissent avec CFTR et jouent un rôle dans son adressage vers la membrane sans pour autant être directement impliquées dans le système de contrôle qualité de la cellule.

Ainsi dans sa portion C-terminale, CFTR possède une séquence consensus très conservée entre les espèces (thréonine – leucine – arginine ou T-R-L) et capable d'interagir avec des protéines portant un motif PDZ (Fig.19). Le terme PDZ provient des initiales des trois premières protéines découvertes avec un tel motif (postsynaptic density-95 / disc large / zonula occludens-1).

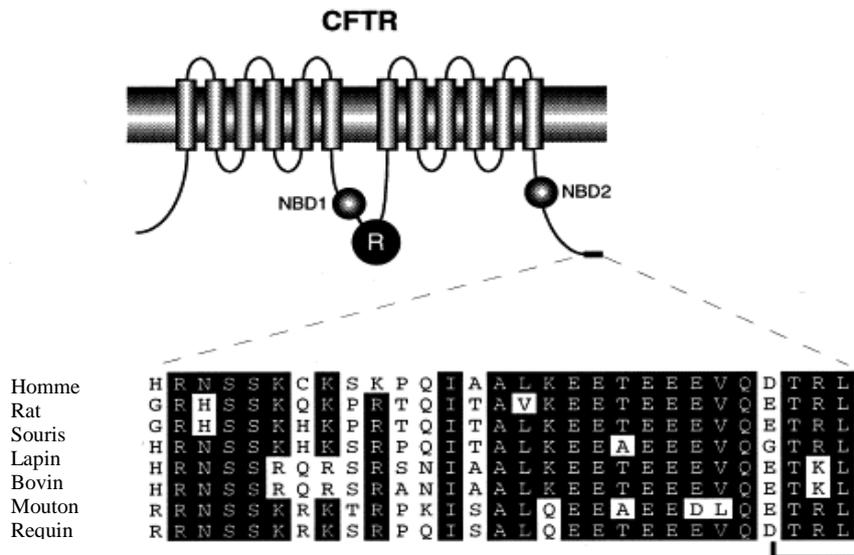


Figure 19. Schéma de la structure de la protéine CFTR et alignement des séquences de la portion C-terminale de différentes espèces (d'après Wang *et al.*, 1998).

De nombreuses études s'intéressent aux protéines à domaines PDZ dont le nombre de représentants augmente régulièrement. Les domaines PDZ sont des séquences conservées d'environ 90 acides aminés retrouvées sur les protéines intracellulaires. Ils sont constitués de 6 feuillets  $\beta$  et 2 hélices  $\alpha$  qui forment une cavité capable de recevoir un motif de 3 à 7 acides aminés généralement localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine cible (Fig.20). Cependant, des séquences internes de protéines se liant à des domaines PDZ ont été décrites (Hillier *et al.*, 1999 ; Paasche *et al.*, 2005).

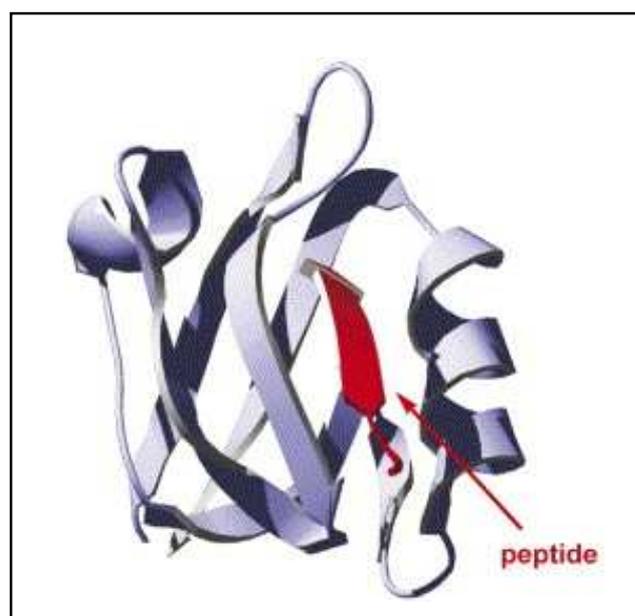


Figure 20. Représentation tridimensionnelle d'un domaine PDZ et la localisation de sa séquence peptidique cible (d'après Zimmermann, 2006).

Un domaine PDZ est suffisamment flexible pour reconnaître plusieurs protéines cibles, même si l'interaction s'effectue avec une affinité variable selon chaque cible. Aussi, un même motif peptidique peut être reconnu par plusieurs domaines PDZ. Ces motifs d'interaction avec les domaines PDZ sont des séquences consensus qui peuvent être classées en 4 groupes (pour revue : Dev, 2004) :

- Type I (S/T-x-Φ)
  - Type II (Φ-x-Φ)
  - Type III (Ψ-x-Φ)
  - Type IV (D-x-V)
- } x représente n'importe quel acide aminé.  
 } Φ représente un acide aminé hydrophobe (A, C, F, G, I, L, M, V, W).  
 } Ψ représente un acide aminé hydrophile (H, K, R).

CFTR portant la séquence C-terminale T-R-L, il possède un motif PDZ de type I.

Une même protéine peut porter plusieurs domaines PDZ différents et ainsi interagir avec différentes cibles protéiques. Cela permet de constituer des complexes macromoléculaires rassemblant des protéines se régulant mutuellement ou impliquées dans la même voie de signalisation. Ainsi, les protéines à domaines PDZ jouent généralement un rôle prépondérant dans l'adressage membranaire de leurs protéines cibles, leur recyclage endocytaire ainsi que leur fonction grâce à leur capacité à générer un réseau contenant diverses protéines régulatrices. Certaines protéines PDZ sont capables de former des homo ou hétérodimères, complexifiant encore davantage les possibilités de constitution de réseau protéique. L'expression des protéines PDZ peut varier selon les organes et les tissus, certaines étant presque ubiquitaires, d'autres étant spécifiques d'un type cellulaire. Selon les organes et tissus considérés, l'ensemble des protéines PDZ peut ainsi être impliqué dans la morphologie cellulaire, la polarité cellulaire, les contacts inter-cellulaires, la migration, la croissance cellulaire.

Les protéines NHE-RF (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Regulatory Factor) sont une famille de protéines à domaines PDZ décrites pour interagir avec CFTR. NHE-RF1, également connu sous le nom EBP50 (Ezrin-radixin-moesin Binding Phosphoprotein 50 kDa), est le plus étudié de la famille, c'est la première protéine évoquée comme interagissant *via* ses domaines PDZ avec CFTR (Hall *et al.*, 1998 ; Short *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1998). La famille NHE-RF compte au total quatre membres. NHE-RF1 et NHE-RF2 (aussi appelé E3KARP : NHE3 Kinase A Regulatory Protein), possèdent deux domaines PDZ alors que NHE-RF-3 (aussi appelé PDZK1, CAP70 ou NaPi CAP-1) et NHE-RF4 (aussi appelé IKEPP ou NaPi CAP-2) en possèdent quatre. De plus, NHE-RF1 et NHE-RF2 possèdent à leur extrémité C-terminale

un domaine d'interaction avec l'eitrine qui permet l'ancrage de CFTR au cytosquelette d'actine (Reczek *et al.*, 1997).

NHE-RF1 et NHE-RF2 remplissent une fonction similaire mais ces deux protéines ont une expression mutuellement exclusive (Ingraffea *et al.*, 2002) ; ou bien lorsqu'elles sont exprimées dans la même cellule, leur localisation est différente (Fouassier *et al.*, 2001). Au niveau pulmonaire, NHE-RF2 est plutôt exprimé dans les cellules alvéolaires alors que NHE-RF1 est exprimé dans les cellules épithéliales (Ingraffea *et al.*, 2002).

Seul le premier domaine PDZ de NHE-RF1 interagit avec CFTR (Wang *et al.*, 1998), alors que pour NHE-RF2 c'est le second domaine PDZ (Hall *et al.*, 1998 ; Sun *et al.*, 2000). Lorsqu'il n'est pas lié à l'eitrine, NHE-RF1 est engagé dans une interaction d'auto-inhibition. En effet, sa portion C-terminale se lie au domaine PDZ2 et cette interaction est supprimée grâce à la phosphorylation par la PKC (Li *et al.*, 2007). La queue C-terminale de NHE-RF1 est alors libre d'interagir avec l'eitrine liée au cytosquelette d'actine, et cette interaction permet au motif PDZ2 de fixer une protéine CFTR seulement si PDZ1 est lui aussi engagé dans une liaison avec une molécule CFTR, créant ainsi un dimère de CFTR (Li J. *et al.*, 2005) (Fig.21). Par ailleurs, NHE-RF1 retient RACK1, une protéine d'ancrage pour la PKC, ce qui facilite la levée de l'auto-inhibition de NHE-RF1 (Liedtke *et al.*, 2006) et peut également faciliter la régulation de CFTR par cette kinase. L'eitrine possède également un site de fixation pour la PKA, permettant ainsi de rapprocher la PKA de CFTR (Sun *et al.*, 2000) (Fig.21).

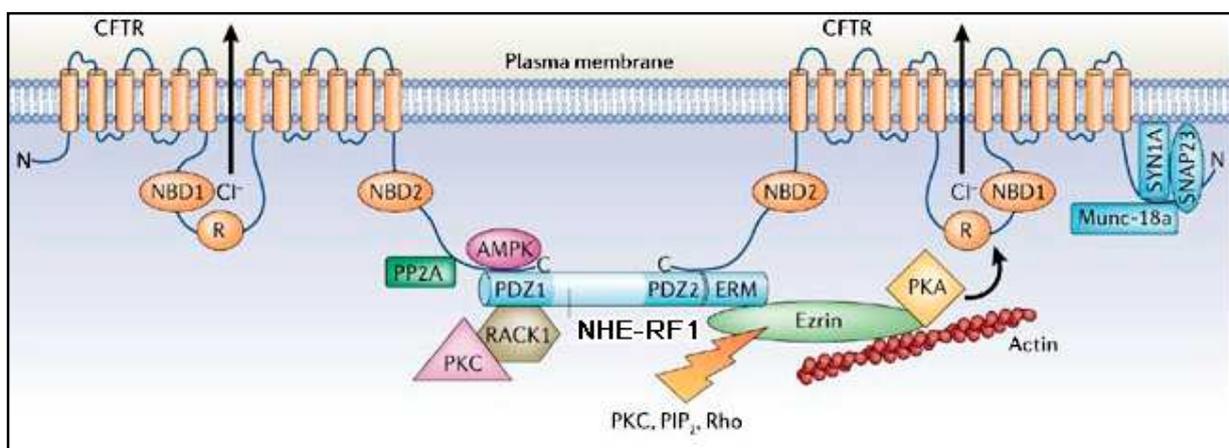


Figure 21. Illustration de la formation d'un dimère de CFTR et du complexe multiprotéique par l'intermédiaire de NHE-RF1 (d'après Guggino & Stanton, 2006).

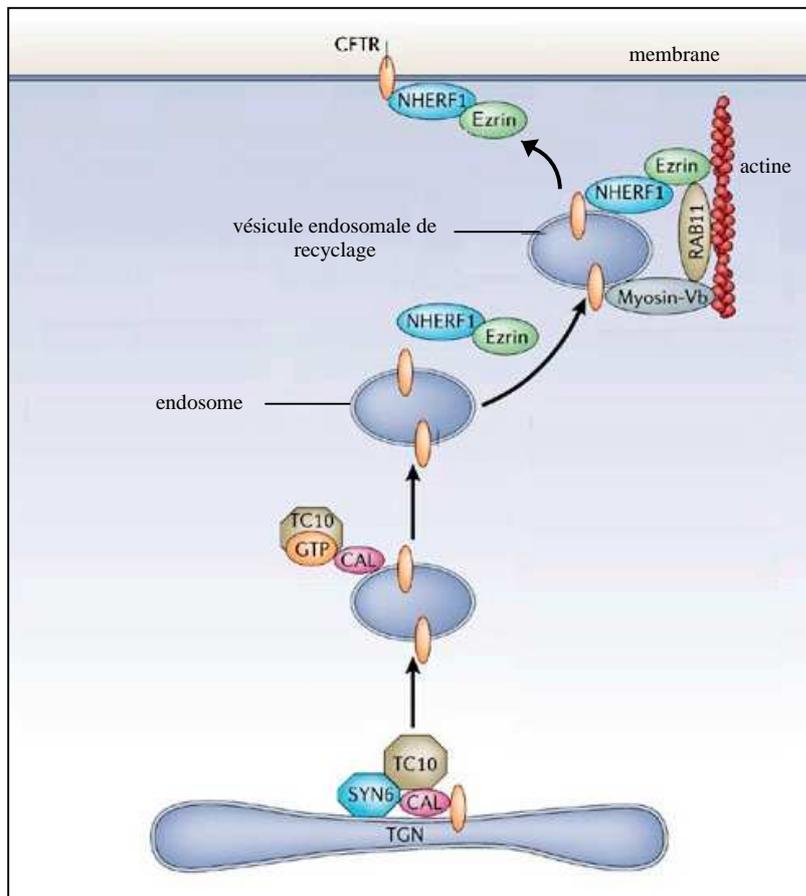
Si l'interaction entre CFTR et NHE-RF1/2 est abolie par mutation ou délétion de l'extrémité C-terminale de CFTR alors l'expression apicale de CFTR est fortement diminuée (Moyer *et al.*, 1999 ; Moyer *et al.*, 2000). Les séquences d'interaction avec les domaines PDZ représentent donc un signal pour le transport et la localisation apicale de CFTR. Mais d'autres séquences de l'extrémité C-terminale ont un rôle dans la maturation et/ou la stabilité de la protéine à la membrane. En effet, 3 régions ont été identifiées à ce niveau. Deux d'entre elles (résidus 1400-1404 et 1413-1416) sont importantes pour stabiliser CFTR à la membrane, alors que les résidus compris entre 1380 et 1400 ont un effet négatif puisque leur délétion augmente le taux de CFTR mature à la membrane (Gentzsch & Riordan, 2001).

Contrairement à NHE-RF-1/2, NHE-RF-3 et NHE-RF-4 ne peuvent pas ancrer CFTR au cytosquelette. Leur interaction avec les protéines CFTR semble seulement favoriser leur dimérisation et stimuler leur fonction à la membrane comme cela a été clairement démontré pour NHE-RF-3 (Wang S *et al.*, 2000).

Il existe au moins deux autres protéines interagissant avec CFTR par leurs domaines PDZ mais qui n'appartiennent pas à la famille NHE-RF. Il s'agit de CAL (CFTR associated ligand) et Shank2 (Cheng *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2004). Contrairement aux membres de la famille NHE-RF qui ont un effet bénéfique sur l'adressage et la fonction de CFTR, ces deux protéines présentent des propriétés inhibitrices de l'expression apicale et de l'activité chlorure de CFTR. Cet effet négatif résulte de la compétition entre NHE-RF1 et CAL/Shank2 pour la liaison à CFTR (Cheng *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2007). En plus de cette simple inhibition compétitive, CAL peut cibler CFTR vers la dégradation (Cheng *et al.*, 2004). L'activité de CAL est contrôlée par une Rho GTPase appelée TC10. Lorsque TC10 est activée par liaison du GTP, l'inhibition de CFTR par CAL est abolie, ce qui favorise l'expression membranaire de CFTR (Cheng *et al.*, 2005).

Un modèle a été proposé pour la régulation de l'adressage de CFTR mature du compartiment post-golgien jusqu'à la membrane apicale (Fig.21). Selon ce modèle, CAL est lié à la syntaxine 6 qui l'ancre au réseau post-golgien et à la Rho GTPase TC10. Lorsque TC10 est activée par le GTP, le complexe TC10-CAL-CFTR est dirigé vers l'endosome. A ce niveau, NHE-RF1 remplace CAL, et les vésicules vont pouvoir acheminer CFTR jusqu'à la membrane plasmique apicale. Le transit de CFTR depuis les endosomes vers la membrane apicale est régulé par des protéines G monomériques, les Rab GTPases, qui assurent le

transport et la fusion des vésicules avec la membrane cible appropriée. Ainsi, deux petites protéines G, Rab11 et Rme1, contrôlent cette étape d'adressage de CFTR (Picciano *et al.*, 2003 ; Swiatecka-Urban *et al.*, 2005). En fait, il existe un complexe formé par CFTR, Rab11 et la myosine Vb qui fixe Rab11 et permet la migration le long des filaments d'actine (Swiatecka-Urban *et al.*, 2007) (Fig.22).



**Figure 22. Modèle de régulation de l'adressage de CFTR selon ses partenaires protéiques (modifié d'après Guggino & Stanton, 2006).**

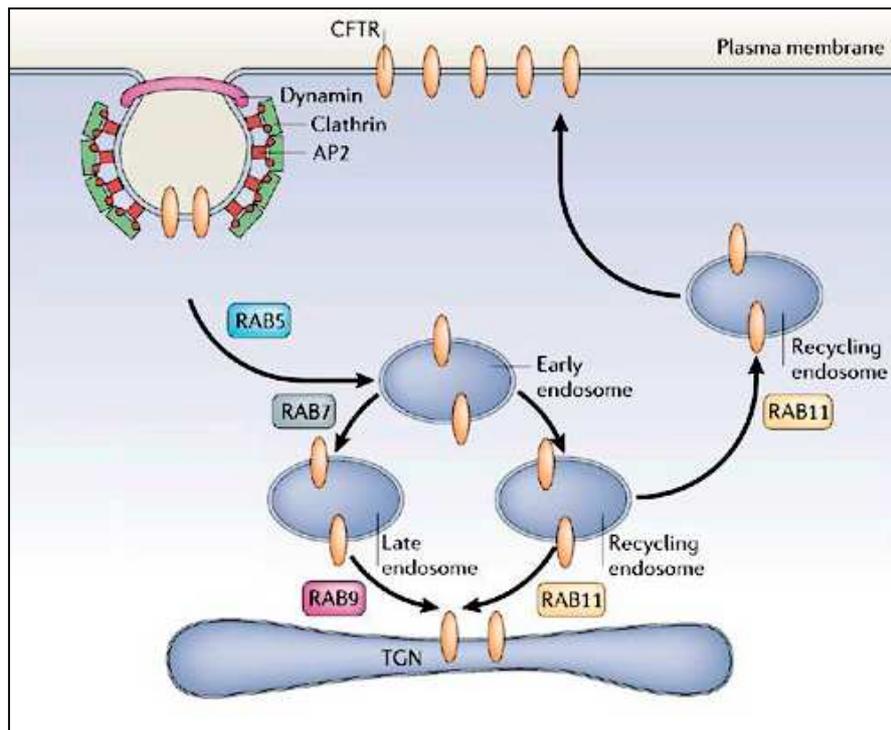
CAL : CFTR associated ligand ; SYNB : syntaxine 6 ; TGN : trans-golgi network = réseau trans-golgien.

### 3- Recyclage endocytique de CFTR

Une fois à la membrane, CFTR connaît une endocytose rapide par des vésicules à clathrine (Bradbury *et al.*, 1994 ; Lukacs *et al.*, 1997 ; Prince *et al.*, 1994). En effet, le domaine C-terminal de CFTR interagit directement avec AP-2, une protéine constitutive des manteaux de clathrine (Weixel & Bradbury, 2000). Les protéines CFTR ainsi internalisées constituent un "pool" sub-apical de protéines fonctionnelles qui peuvent soit être à nouveau adressées à la membrane plasmique, soit être dirigées vers les endosomes par une séquence signal située dans l'extrémité C-terminale de CFTR (Hu *et al.*, 2001). Mais il existe aussi de tels signaux sur d'autres domaines cytosoliques de CFTR puisque certaines mutations de classe VI au niveau des boucles intracellulaires font apparaître un motif d'internalisation sans affecter la biosynthèse, ni les caractéristiques électrophysiques de CFTR (Silvis *et al.*, 2003).

Récemment, la calréticuline, une lectine luminale du RE dont l'activité chaperonne dépend du calcium, a été montrée comme inhibitrice de l'expression membranaire de CFTR (Harada *et al.*, 2006). Pourtant cette chaperonne n'intervient pas dans la maturation de CFTR au niveau du RE. En fait, la régulation négative de la calréticuline sur CFTR n'aurait pas lieu au niveau du RE mais au niveau apical des cellules. La calréticuline serait excrétée et interagirait directement avec CFTR pour stimuler son internalisation, l'activité lectine de la calréticuline n'étant pas indispensable pour cette reconnaissance (Harada *et al.*, 2006).

La balance entre l'endocytose de CFTR membranaire et l'exocytose de CFTR sub-apical est modulée par l'AMPC qui stimule l'exocytose et inhibe l'endocytose (Bradbury *et al.*, 1992 ; Prince *et al.*, 1994). De façon similaire au transit de CFTR depuis l'endosome vers la membrane apicale, l'endocytose de CFTR vers les endosomes est régulée par les protéines G monomériques. Ainsi, Rab5 régule l'adressage des protéines CFTR membranaires vers l'endosome (Gentzsch *et al.*, 2004) (Fig.23). Ensuite, CFTR peut transiter soit vers l'endosome tardif puis l'appareil de Golgi *via* Rab7 et Rab9 respectivement (Gentzsch *et al.*, 2004) (Fig.23), soit vers les vésicules endosomales de recyclage puis la membrane plasmique, comme vu précédemment, *via* Rab11 et Rme1 (Picciano *et al.*, 2003 ; Swiatecka-Urban *et al.*, 2005) (Fig.22 et 23).



**Figure 23.** Régulation par les Rab GTPases du trafic de CFTR entre la membrane plasmique, les endosomes et l'appareil de Golgi (d'après Guggino & Stanton, 2006).

De la même manière que la myosine Vb régule l'exocytose de CFTR, la myosine VI sert de protéine adaptatrice pour l'endocytose de CFTR dans des vésicules à clathrine et son transport le long des filaments d'actine (Swiatecka-Urban *et al.*, 2004).

L'extrémité C-terminale de CFTR est un élément clé de la modulation de son expression membranaire apicale. Premièrement, elle stabilise CFTR à la membrane apicale en l'ancrant au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de NHE-RF1 et de l'eitrine. Deuxièmement, elle joue un rôle primordial dans le recyclage endocytique de CFTR car, lorsqu'elle est supprimée, le recyclage de CFTR vers la membrane est annihilé et il est adressé à la dégradation (Haardt *et al.*, 1999 ; Benharouga *et al.*, 2001 ; Swiatecka-Urban *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'extrémité N-terminale de CFTR est également importante pour sa stabilité apicale. En effet, par son extrémité N-terminale, CFTR interagit avec la filamine, protéine essentielle pour le cytosquelette car elle maintient entre eux les filaments d'actine. Cette interaction de la filamine avec CFTR limite son endocytose et sa dégradation (Thelin *et al.*, 2007).

#### 4- Dégradation de CFTR

La dégradation de la protéine CFTR peut avoir lieu à différents niveaux et par différents mécanismes.

La protéine CFTR est synthétisée au niveau du RE sous une forme immature, partiellement glycosylée. Un quart seulement des protéines sauvages transitent au travers de l'appareil de Golgi où elles achevent leur maturation et gagnent la membrane plasmique apicale pour y remplir leur fonction. La majorité de CFTR sauvage immature ne poursuit donc pas sa maturation et est rapidement dégradée. En effet, les protéines CFTR sauvages mal conformées sont reconnues par les protéines chaperonnes et dirigées vers la destruction par le protéasome associée au RE et appelée ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation) (McCracken & Brodsky, 1996). L'adressage vers le protéasome qui se trouve dans le cytosol, nécessite un signal spécifique. Ce signal est double : poly-ubiquitinylation des protéines CFTR cibles d'une part, et déglycosylation totale de ces protéines d'autre part (Ward *et al.*, 1995 ; Bebok *et al.*, 1998a). Les protéines ubiquitinylées sont concentrées dans des micro-domaines du RE puis transloquées vers le cytosol suite à l'interaction avec le complexe trimérique Sec61 localisé dans la membrane du RE (Bebok *et al.*, 1998a ; Fu *et al.*, 2003). D'autres protéines impliquées dans de tels complexes de translocation protéiques sont capables d'interagir avec les protéines CFTR mal conformées (Goldstein *et al.*, 2007). Une fois dans le cytosol, CFTR déglycosylé et ubiquitinylé est détruit par le protéasome. Mais lorsque celui-ci est saturé ou inhibé, les protéines CFTR ubiquitinylées s'accumulent sous forme d'aggrésomes (Johnston *et al.*, 1998). Une autre voie de dégradation indépendante de l'ATP est également envisagée à la sortie du RE mais n'a pas été clairement identifiée (Jensen *et al.*, 1995).

Par ailleurs, CFTR peut également être dégradé à la sortie de l'appareil de Golgi si la GTPase TC10 n'est pas activée par le GTP ou si son interaction avec CAL n'est pas remplacée par NHE-RF1 (Cheng *et al.*, 2005). En effet, la liaison prolongée à CAL oriente les vésicules endosomales contenant CFTR vers les lysosomes, compartiment intracellulaire acide contenant des enzymes protéolytiques.

Les protéines CFTR matures qui ont atteint la membrane plasmique peuvent également être dégradées par une voie menant aux lysosomes ou au protéasome. Comme décrit précédemment, l'endocytose de CFTR et son transit vers l'endosome tardif sont régulés par les

GTPases Rab5 et Rab7 respectivement (Gentzsch *et al.*, 2004) (Fig.23). Mais Rab7 régule également le ciblage de CFTR de l'endosome tardif vers les lysosomes où il sera dégradé (Gentzsch *et al.*, 2004). La dégradation de CFTR mature par le protéasome implique des ubiquitine-ligases spécifiques, différentes de celles trouvées dans le RE (Sharma *et al.*, 2004).

La figure 24 résume la voie de synthèse, maturation et dégradation de la protéine CFTR sauvage.

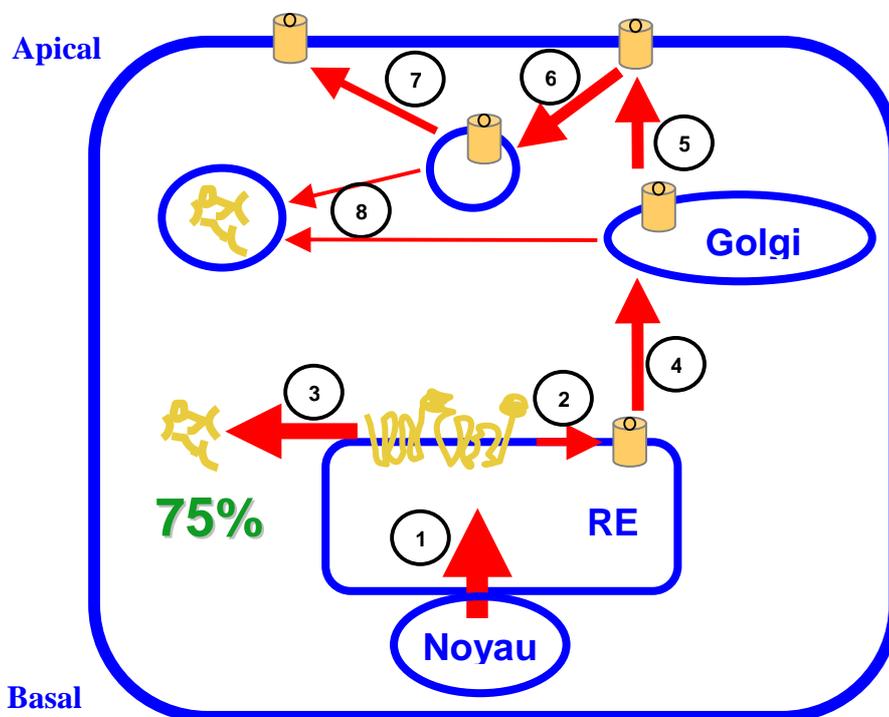


Figure 24. Schéma récapitulatif des voies de synthèse et de dégradation de CFTR (modifié d'après Gelman & Kopito, 2002).

- |   |  |   |                                      |
|---|--|---|--------------------------------------|
| ① | Transcription, traduction et intégration à la membrane du RE | ⑤ | Adressage à la membrane plasmique    |
| ② | Maturation conformationnelle                                 | ⑥ | Endocytose rapide                    |
| ③ | Dégradation par le protéasome                                | ⑦ | Recyclage vers la membrane plasmique |
| ④ | Transfert vers l'appareil de Golgi                           | ⑧ | Dégradation lysosomale               |

### 5- La protéine mutée $\Delta F508$

Alors que 25% des protéines CFTR sauvages parviennent à traverser toutes les étapes de maturation, pratiquement la totalité du "pool" protéique du mutant  $\Delta F508$  synthétisé est dégradé prématurément au niveau du RE (Lukacs *et al.*, 1994 ; Ward & Kopito, 1994) (Fig.25).

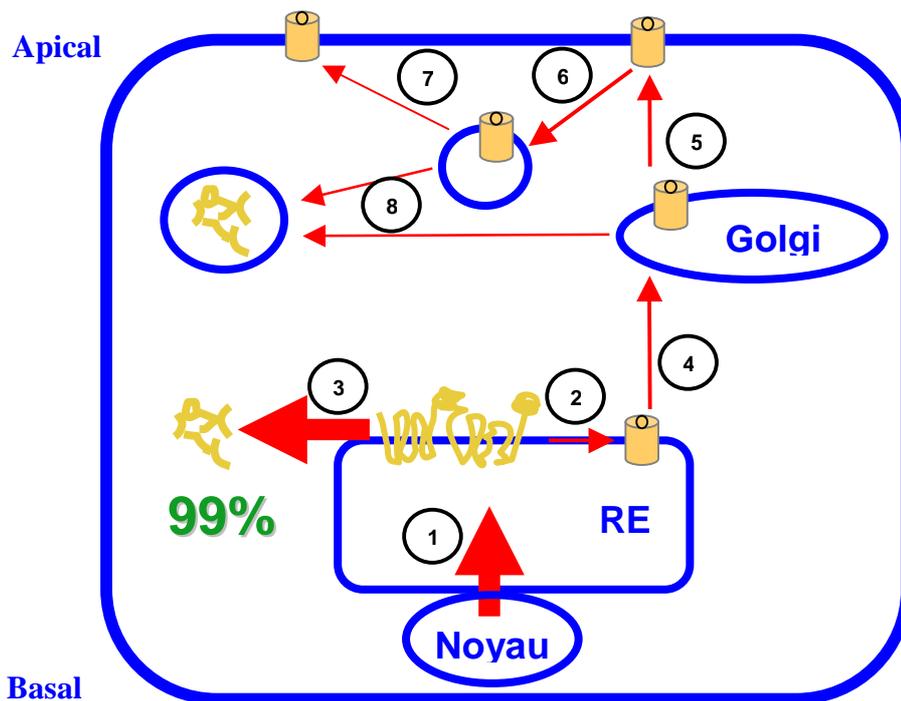


Figure 25. Schéma de la voie de synthèse et de dégradation de CFTR (modifié d'après Gelman & Kopito, 2002).

- |  |  |
|--|--|
| ① Transcription, traduction et intégration à la membrane du RE | ⑤ Adressage à la membrane plasmique    |
| ② Maturation conformationnelle                                 | ⑥ Endocytose rapide                    |
| ③ Dégradation par le protéasome                                | ⑦ Recyclage vers la membrane plasmique |
| ④ Transfert vers l'appareil de Golgi                           | ⑧ Dégradation lysosomale               |

La mutation  $\Delta F508$  est localisée au niveau du domaine NBD1. Or, c'est ce domaine cytosolique de CFTR qui s'associe transitoirement avec le complexe chaperon Hsc70/Hdj-2. Il en résulte une interaction prolongée avec  $\Delta F508$  conduisant à sa rétention dans le RE (Yang *et al.*, 1993b). Ainsi, le nombre de complexes entre Hsc70 et  $\Delta F508$  est 2 fois plus élevé qu'avec CFTR sauvage (Meacham *et al.*, 1999). Cette interaction prolongée est un signal pour la dégradation de la protéine. En effet, une autre co-chaperonne, CHIP (C-terminal Hsc70 Interacting Protein), transforme Hsc70 en facteur de dégradation (Ballinger *et al.*, 1999 ; Meacham *et al.*, 2001). CHIP a une fonction d'ubiquitine-ligase spécifique des protéines mal conformées (Jiang *et al.*, 2001 ; Murata *et al.*, 2001). L'interaction prolongée entre  $\Delta F508$  et Hsc70 recrute CHIP qui va ubiquitinyler la protéine CFTR, la dirigeant ainsi vers la dégradation protéasomale (Meacham *et al.*, 2001). D'ailleurs, CHIP peut être inhibé par HspBP1 ou par BAG-2, deux co-chaperonnes intégrées au complexe multiprotéique de Hsc70. Cela inhibe l'ubiquitinylation de CFTR (sauvage ou muté) et entraîne une augmentation de son adressage vers la membrane plasmique (Alberti *et al.*, 2004 ; Arndt *et al.*, 2005 ; Younger *et al.*, 2004). En outre, un autre complexe travaillant en coopération avec Hsc70 et ses co-chaperonnes est également capable de reconnaître, par l'intermédiaire d'une protéine (Derlin-1), les mauvaises conformations de CFTR avant même l'intervention de Hsc70. La Derlin-1 retient le mutant  $\Delta F508$  dans le RE, favorisant ainsi son ubiquitinylation et sa dégradation protéasomale (Younger *et al.*, 2006). L'inhibition de la Derlin-1 par interférence ARN (RNAi) inhibe la destruction par le protéasome de CFTR sauvage et muté  $\Delta F508$  et provoque leur accumulation dans le RE sans augmenter leur maturation et leur adressage vers la membrane (Sun *et al.*, 2006).

Tout comme la protéine sauvage,  $\Delta F508$  est ensuite transférée vers Hsp90 dont l'inhibition provoque la dégradation de l'ensemble du pool de mutants  $\Delta F508$  du RE (Loo *et al.*, 1998). En revanche, l'inhibition de Aha1, une co-chaperonne de Hsp90, permet l'expression membranaire de  $\Delta F508$  et une restauration du transport d'ions chlorures (Wang *et al.*, 2006). En outre, il a été démontré que Hsp90 interagit également avec la co-chaperonne CHIP (Connell *et al.*, 2006). CHIP modulerait donc, comme pour Hsc70, l'activité de Hsp90, pouvant peut-être le transformer en facteur de dégradation lors d'une interaction prolongée avec  $\Delta F508$ .

La troisième chaperonne intervenant dans la maturation de CFTR, la calnexine, est décrite pour retenir dans le RE les protéines CFTR incorrectement repliées. Les effets de la

sur-expression ou de l'inhibition de la calnexine sont controversés. Pour certains auteurs, la sur-expression de la calnexine provoquerait une accélération de la dégradation de  $\Delta F508$  dans le RE mais pas de la protéine sauvage, et son inhibition n'aurait pas d'impact sur le mutant (Farinha *et al.*, 2005). Pour d'autres, sa sur-expression entraînerait une augmentation du pool de mutants  $\Delta F508$  dans le RE sans augmenter sa dégradation ; et l'inhibition de la calnexine par compétition avec une calnexine mutée permettrait la maturation complète de  $\Delta F508$  avec restauration partielle d'une fonction chlorure (Okiyonedo *et al.*, 2002 ; Okiyonedo *et al.*, 2004). Mais ces dernières expériences ont utilisé des vecteurs viraux susceptibles d'augmenter l'expression de Hsp70, ce qui biaiserait les résultats obtenus (Wu *et al.*, 1986). Par ailleurs, la fonction de la calnexine dépend de la concentration calcique dans le RE. Il a ainsi été montré que la déplétion chronique en calcium du RE par administration orale de curcumine, inhibe la calnexine et permet de restaurer une localisation apicale et une activité chlorure du mutant  $\Delta F508$  chez la souris (Egan *et al.*, 2004). Ces résultats vont dans le sens de ceux avancés par Okiyonedo et ses collaborateurs. Les mêmes résultats ont d'ailleurs été obtenus avec la curcumine et d'autres inhibiteurs de la pompe calcique du RE (SERCA : Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase) sur des cellules épithéliales humaines des voies aériennes homozygotes pour  $\Delta F508$  (Norez *et al.*, 2006a). Cependant l'effet positif de ces inhibiteurs calciques est contesté et ne semble pas être généralisé à tous les organes (Dragomir *et al.*, 2004 ; Song *et al.*, 2004 ; Grubb *et al.*, 2006). En outre, l'administration orale d'un inhibiteur de l'alpha-1,2-glucosidase, le miglustat, empêche également l'interaction CFTR/calnexine et restaure la localisation et la fonction de  $\Delta F508$  chez des souris homozygotes pour la mutation (Norez *et al.*, 2006b).

Pour résumer ces résultats parfois contradictoires, il semblerait que le défaut de  $\Delta F508$  soit en partie reconnu avant l'intervention de la calnexine, sûrement par le complexe d'ubiquitinylation lié à la chaperonne Hsc70, et adresse le mutant vers la dégradation protéasomale. Au contraire, une partie de CFTR sauvage parvient à passer les différentes étapes du contrôle qualité du RE pour mûrir dans l'appareil de Golgi et atteindre la membrane plasmique. Les protéines chaperonnes ont donc pour mission d'adresser à la membrane apicale seulement les protéines CFTR correctement repliées et glycosylées, c'est-à-dire celles qui ont les meilleures chances d'être fonctionnelles.

Par ailleurs, la mutation  $\Delta F508$  se situe au cœur de NBD1 et empêcherait une interaction transitoire entre NBD1 et NBD2 pendant la maturation de la protéine (Du *et al.*,

2005). Il semble en fait que les interactions inter-domaines sont essentielles pour former une structure stable et compacte qui satisfasse le contrôle qualité de la cellule. La mutation  $\Delta F508$  empêche des interactions entre différents domaines au sein même de la protéine car cette mutation bloque la maturation de la protéine  $\Delta F508$  déléetée de son domaine NBD2, ce qui n'est pas le cas pour la protéine sauvage déléetée également du domaine NBD2 (Cui *et al.*, 2007).

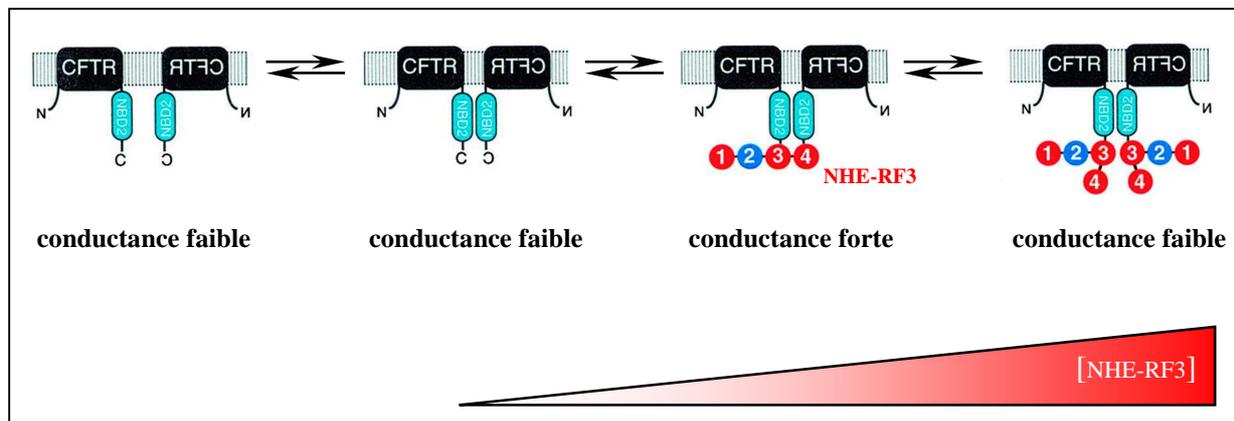
En outre, le mutant  $\Delta F508$  est thermosensible, si bien que lorsque les cellules l'exprimant sont cultivées à des températures inférieures à 30°C, il échappe au contrôle qualité de la cellule et atteint la membrane plasmique (Denning *et al.*, 1992a). La stabilité de  $\Delta F508$  a été mesurée dans ces conditions, et sa demi-vie à la membrane apicale (< 4h) est très inférieure à celle de la protéine sauvage (> 24h) (Lukacs *et al.*, 1993). Il a d'ailleurs été démontré que cette demi-vie réduite est due à une augmentation spécifique de l'endocytose du mutant, sans augmenter l'internalisation des autres protéines membranaires (Swiatecka-Urban *et al.*, 2005). En effet, le mutant  $\Delta F508$  voit son endocytose stimulée du fait d'une ubiquitinylation augmentée, ce qui le cible également pour la dégradation (Sharma *et al.*, 2004). En revanche, si l'ubiquitinylation est inhibée, le mutant  $\Delta F508$  est capable de suivre les mêmes voies de recyclage endocytique que son homologue sauvage (Gentzch *et al.*, 2004).

## **6- Structure fonctionnelle de CFTR : monomère ou dimère ?**

Même s'il est avéré que CFTR sous forme monomérique est capable de conduire les ions chlorures lorsqu'il est purifié dans des membranes (Ramjeesingh *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2005), son existence fonctionnelle sous forme dimérique *in vivo* fait débat.

La protéine CFTR solubilisée dans divers détergents migre comme un monomère à travers un gradient de saccharose (Chen *et al.*, 2002). De plus, deux protéines CFTR marquées chacune d'un tag différent ne sont pas co-immunoprécipitées lorsqu'elles sont co-exprimées (Marshall *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 2002). La forme tridimensionnelle de CFTR monomérique a été décrite après cristallisation de la protéine purifiée (Rosenberg *et al.*, 2004). Mais les auteurs n'excluent pas l'existence d'une forme dimérique.

La première étude apportant un argument en faveur de l'existence sous forme dimérique de CFTR a consisté en l'analyse par microscopie électronique d'une portion de membrane après cryofracture. CFTR est constitué au total de 12 hélices  $\alpha$  transmembranaires. Or, cette étude a décrit une structure proche d'une conformation à 24 hélices  $\alpha$  (Eskandari *et al.*, 1998). Cependant, la dimérisation de CFTR ne semble pas être directe mais ferait intervenir les protéines à domaines PDZ. Ainsi NHE-RF3 est capable de lier deux molécules CFTR conduisant ainsi à un état de forte conductance chlorure lorsque le canal est activé (Wang *et al.*, 2000) (Fig.26). Ce gain de conductance de CFTR résulte de l'augmentation de la probabilité d'ouverture du canal et de l'allongement de sa durée moyenne d'ouverture. Par contre, à de fortes concentrations de NHE-RF3, l'effet bénéfique disparaît (Wang S *et al.*, 2000) (Fig.26).



**Figure 26. Modèle proposé pour la dimérisation et l'activation de CFTR en fonction de la concentration de NHE-RF3 (modifié d'après Wang S *et al.*, 2000).**

Les domaines PDZ de NHE-RF3 sont numérotés de 1 à 4. Les domaines PDZ en rouge sont capables de se fixer à CFTR. Le domaine PDZ en bleu n'interagit pas avec CFTR.

Une augmentation croissante des concentrations de NHE-RF1 ou NHE-RF2 conduit à une dimérisation de la protéine CFTR et à son activation maximale, puis au-delà d'une concentration critique, l'activation de CFTR décroît. A partir de ces observations, un modèle similaire à celui de la figure 26 a été proposé (Raghuram *et al.*, 2001).

Par ailleurs, des dimères de CFTR peuvent être détectés par Western blot et par liaison chimique croisée (cross-linking) aussi bien dans des systèmes cellulaires de réexpression que

dans des lignées exprimant CFTR de façon native, ce qui renforce l'hypothèse de l'existence de CFTR sous forme dimérique (Li *et al.*, 2004 ; Ramjeesingh *et al.*, 2001 ; Ramjeesingh *et al.*, 2003). En outre, l'équipe ayant décrit la structure tridimensionnelle d'un CFTR monomérique après cristallisation a ensuite présenté des résultats en cohérence avec une association dimérique de CFTR (Awayn *et al.*, 2005).

En résumé, les deux conformations de CFTR, monomérique et dimérique, sont présentes et fonctionnelles dans les cellules mais la forme dimérique présente une plus forte conductance chlorure. Par ailleurs, la forme dite monomérique de CFTR ne l'est probablement pas au sens strict car par le biais des partenaires à domaines PDZ, CFTR est capable de former des complexes avec d'autres protéines membranaires qui peuvent également influencer sa fonction.

## IV- FONCTIONS DE CFTR

Les rôles imputés à CFTR sont multiples et expliquent la difficulté à relier l'ensemble des manifestations phénotypiques de la mucoviscidose. Il est maintenant reconnu que la protéine CFTR est un canal à conductance chlorure régulé principalement par l'AMPc. Mais CFTR semble également perméable à d'autres ions et petites molécules. De plus, il joue un rôle de régulateur d'autres canaux ioniques et semble être impliqué dans la régulation de la fusion des endosomes et du pH intracellulaire (Schwiebert *et al.*, 1999).

### 1- CFTR est une protéine canal

Dans les années 1980, il a été démontré que la membrane apicale épithéliale est le siège d'une conductance chlorure activé par la voie AMPc/PKA et que cette conductance est défectueuse en cas de phénotype mucoviscidosique. Après le clonage du gène en 1989, la fonction de canal chlorure de CFTR n'était toujours pas certifiée car, même si CFTR corrigeait le défaut de sécrétion chlorure des cellules mucoviscidosiques, on ne savait pas si l'effet était dû à une propriété canal de CFTR ou à la régulation d'un canal chlorure par la protéine CFTR (Rich *et al.*, 1990 ; Anderson *et al.*, 1991c ; Kartner *et al.*, 1991). Il faut attendre de voir que des mutations des lysines en position 95 et 335 modifient la séquence de perméabilité aux halogénures, passant de  $\{Br^- > Cl^- > I^- > F^-\}$  à  $\{I^- > Br^- > Cl^- > F^-\}$ , pour certifier que CFTR est un canal ionique à conductance chlorure *in vivo* (Anderson *et al.*, 1991b).

Il a ensuite été démontré que le pore de CFTR peut laisser passer plusieurs anions simultanément et même des anions polyatomiques avec la séquence de perméabilité suivante :  $NO_3^- > Cl^- > HCO_3^- > \text{formate} > \text{acétate}$  (Tabcharani *et al.*, 1993 ; Linsdell *et al.*, 1997).

Par ailleurs, CFTR est également perméable au glutathion (Linsdell & Hanrahan, 1998). Le glutathion est un tripeptide ubiquitaire (glutamate-cystéine-glycine) retrouvé dans toutes les cellules eucaryotes. Sa capacité à donner un électron en fait un agent réducteur protégeant les cellules des dommages causées par les espèces oxygénées radicalaires. Le glutathion est exporté vers le milieu extracellulaire si bien qu'on le retrouve au niveau du mucus pulmonaire. Les premières suspicions du rôle de CFTR sur le transport de glutathion sont nées de l'observation d'une diminution de sa concentration dans le mucus et même de façon systémique chez les patients mucoviscidosiques (Roum *et al.*, 1993 ; Gao *et al.*, 1999).

Depuis plusieurs années, une controverse existe à propos de CFTR et la perméabilité à l'ATP. En 1994, une étude suggère que CFTR conduit à la fois les ions chlorures et l'ATP (Reisin *et al.*, 1994). Cette propriété pourrait expliquer les effets pléiotropes observés dans la mucoviscidose. Cependant en 1996, des expériences menées sur des protéines CFTR purifiées et insérées dans des bicouches lipidiques n'ont montré aucune conductance d'ATP, et des résultats similaires ont été obtenus au niveau des glandes sudoripares, d'épithélium reconstitué ou de cellules transfectées avec CFTR (Li *et al.*, 1996a ; Reddy *et al.*, 1996). Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette controverse :

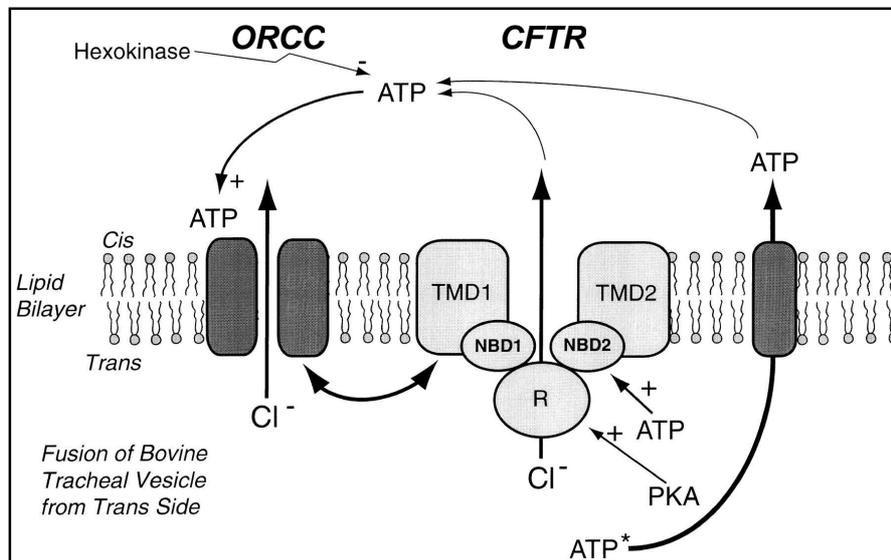
- Un canal conduisant spécifiquement l'ATP serait associé à CFTR. Son absence des bicouches lipidiques justifierait l'absence de conductance d'ATP observée dans ces conditions. Des résultats vont dans ce sens en montrant la présence d'un canal ATP concomitant avec la présence de CFTR. Il serait régulé par CFTR mais resterait perméable à l'ATP même en l'absence de CFTR (Sugita *et al.*, 1998).
- CFTR nécessiterait un régulateur ou un signal additionnel qui entraînerait la conductance de l'ATP. Ce signal serait absent lorsque CFTR est purifié et inséré en bicouches lipidiques.

## **2- CFTR est un régulateur d'autres protéines**

### **1- Le canal chlorure ORCC**

ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) est un canal chlorure rectifiant sortant qui a longtemps été suspecté comme étant la cause de la mucoviscidose (Schoumacher *et al.*, 1987 ; Hwang *et al.*, 1989). Il a ensuite été démontré que ORCC et CFTR sont des protéines distinctes (Ward *et al.*, 1991 ; Gabriel *et al.*, 1993). Néanmoins CFTR et ORCC sont liés fonctionnellement car la régulation d'ORCC est dépendante de l'activité de CFTR (Egan *et al.*, 1992 ; Gabriel *et al.*, 1993). CFTR active en fait le canal ORCC par un mécanisme autocrine/paracrine impliquant l'ATP (Schwiebert *et al.*, 1995). En effet, CFTR permet directement ou indirectement la sortie d'ATP vers le milieu extracellulaire. L'ATP ainsi libéré activerait alors un récepteur purinergique qui stimulerait la conductance chlorure d'ORCC (Schwiebert *et al.*, 1995 ; Hwang *et al.*, 1996) (Fig.27). En outre, il semble que la présence physique de CFTR soit essentielle à la régulation d'ORCC, suggérant ainsi une possible

interaction protéine-protéine entre ces deux canaux (Jovov *et al.*, 1995). Cette interaction passerait par les domaines NBD1 et R (Schwiebert *et al.*, 1998). Par ailleurs, la fonction de canal chlorure de CFTR et sa fonction de régulateur d'ORCC sont indépendantes (Schwiebert *et al.*, 1998).



**Figure 27. Modèle illustrant les différentes hypothèses de régulation du canal chlorure ORCC par CFTR (d'après Schwiebert *et al.*, 1999).**

## 2- L'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

La sécrétion de  $\text{HCO}_3^-$  au niveau du pancréas permet, par son effet tampon, de neutraliser l'acide gastrique et de maintenir ainsi un pH intraluminal optimal pour l'activité des enzymes digestives pancréatiques. Depuis longtemps une diminution de sécrétion de bicarbonate est connue dans la mucoviscidose (Hadorn *et al.*, 1968). Après le clonage de CFTR en 1989, la régulation croisée entre CFTR et les protéines responsables de la libération de  $\text{HCO}_3^-$  a été rapidement suspectée (Smith & Welsh, 1992). Récemment, une famille d'échangeurs anioniques, SLC26 (Solute Carriers), dont certains membres sont des échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , a été identifiée comme étant activée par CFTR (Ko *et al.*, 2002). Par ailleurs, des membres de cette famille se fixent par leur portion C-terminale aux domaines PDZ de NHE-RF-1 et NHE-RF-2 (Lohi *et al.*, 2003). De plus, la partie C-terminale des échangeurs SLC26 porte un domaine STAS (sulfate transporter and anti-sigma) qui interagit avec le domaine R de CFTR. Cette interaction, régulée par la PKA, entraîne une activation mutuelle des deux protéines (Ko *et al.*, 2004).

### 3- Le canal sodique ENaC

Dans la mucoviscidose, le sodium est de manière générale hyperabsorbé sauf au niveau des glandes sudoripares où il est hypoabsorbé. La dysfonction de CFTR est à l'origine de cette anomalie de conduction sodique par les canaux ENaC (Epithelial Na<sup>+</sup> Channel). Alors qu'au niveau des glandes sudoripares CFTR entraîne l'activation d'ENaC (Reddy *et al.*, 1999), dans les autres épithélia, il entraîne son inhibition (Stutts *et al.*, 1995 ; Ismailov *et al.*, 1996). D'ailleurs, ENaC exprimé seul est activé par l'AMPC, alors qu'en présence de CFTR son activité basale est moindre et est inhibée par l'AMPC (Stutts *et al.*, 1995). ENaC régule aussi la fonction de CFTR, mais de façon positive (Jiang *et al.*, 2000). Cette interaction réciproque entre ENaC et CFTR a une signification biologique puisque la quantité de sel et d'eau contenue dans le liquide muco-ciliaire est régulée par cette balance entre la sécrétion chlorure par CFTR et la réabsorption sodique par ENaC.

Le mécanisme précis de la régulation d'ENaC par CFTR est encore flou même s'il est maintenant avéré que les deux canaux interagissent *via* NHE-RF-1 et YAP65 (Yes-associated protein) (Mohler *et al.*, 1999) (Fig.28). YAP65 est capable de fixer une kinase de la famille c-Src, c-YES. Or cette famille de kinases est décrite comme inhibant l'activité d'ENaC (Gilmore *et al.*, 2001). La protéine c-YES sert probablement d'intermédiaire à CFTR pour inhiber ENaC, et NHE-RF-1 joue le rôle d'adaptateur protéique pour former ce complexe de signalisation multiprotéique (Fig.28).

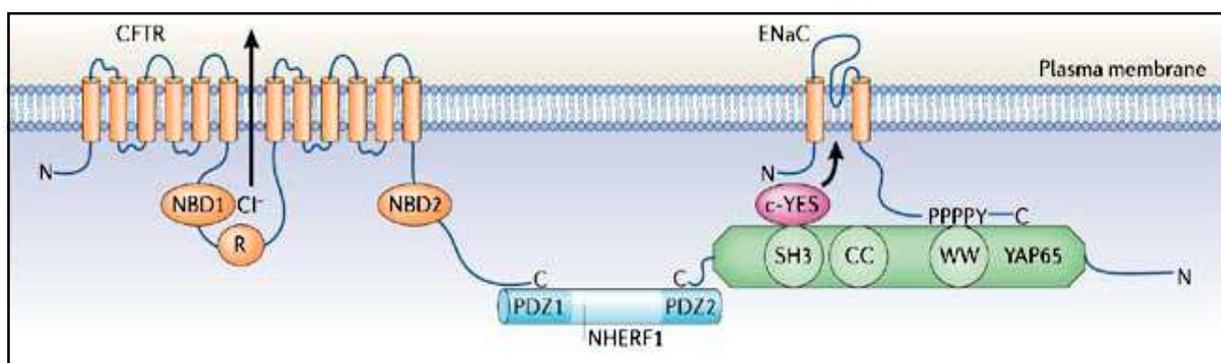


Figure 28. Illustration de la formation du complexe multiprotéique entre NHE-RF1 et ENaC par l'intermédiaire de NHE-RF1 et YAP65 (d'après Guggino & Stanton, 2006).

Les domaines cytosoliques NBD1 et R de CFTR seuls induisent également une inhibition partielle d'ENaC, suggérant leur rôle dans la régulation d'ENaC (Kunzelmann *et al.*, 1997). Il est donc plausible que, comme pour l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , la phosphorylation du domaine R de CFTR entraîne un changement de conformation reconnu par c-YES comme un signal d'inhibition d'ENaC.

En outre, comme pour le canal chlorure ORCC, l'action autocrine/paracrine de la libération d'ATP par CFTR (directement ou indirectement) semble jouer un rôle dans l'inhibition d'ENaC. Cependant, le mécanisme d'action est différent et n'implique pas les récepteurs purinergiques (König *et al.*, 2002). L'ATP extracellulaire peut être clivé par des nucléotidases produisant ainsi de l'adénosine capable d'activer des récepteurs purinergiques qui modulent positivement ou négativement l'activité d'ENaC en fonction de la concentration en adénosine (Ma & Ling, 1996).

#### **4- Les canaux potassiques ROMK**

Plusieurs études ont rapporté que l'expression de CFTR module les courants potassiques, en particulier les courants potassiques rectifiants entrants de type ROMK (Renal Outer Medullar  $\text{K}^+$  ; aussi appelé Kir :  $\text{K}^+$  inward rectifier) (Loussouarn *et al.*, 1996 ; McNicholas *et al.*, 1996). Les canaux potassiques ROMK, d'abord identifiés dans les reins, possèdent quatre variants d'épissage ROMK1, ROMK2, ROMK2b et ROMK3 (Ho *et al.*, 1993 ; Zhou *et al.*, 1994; Boim *et al.*, 1995). CFTR semble réguler les canaux ROMK en les rendant sensibles au glibenclamide, ce qui a comme conséquence d'inhiber les courants potassiques (McNicholas *et al.*, 1996). Tous les isoformes ROMK possèdent une séquence consensus d'interaction avec les domaines PDZ de NHE-RF-1/2, et une étude sur ROMK2 confirme sa liaison physique avec CFTR *via* son association à NHE-RF-1/2 (Yoo *et al.*, 2004). De la même manière que pour les interactions entre CFTR et les canaux ORCC, ENaC, ou l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , l'interaction entre CFTR et ROMK1/2 nécessite la présence des domaines NBD1 et R du canal CFTR (McNicholas *et al.*, 1996 ; McNicholas *et al.*, 1997 ; Cahill *et al.*, 2000). De plus, CFTR confère aux canaux ROMK une sensibilité à l'ATP grâce à un mécanisme régulé par la PKA (Lu *et al.*, 2006).

Par ailleurs, il existe une régulation croisée entre ROMK et ENaC qui a lieu seulement en présence de CFTR. En effet, ENaC stimule spécifiquement le courant potassique de ROMK uniquement si CFTR est également exprimé (Konstas *et al.*, 2002).

## 5- Les aquaporines

Les aquaporines sont de petits canaux multimériques identifiés en 1992 qui laissent passer l'eau de part et d'autre de la membrane plasmique de façon libre et bidirectionnelle (Preston *et al.*, 1992). CFTR joue un rôle dans les échanges d'eau en régulant l'activité des aquaporines, notamment l'aquaporine3 (AQP3) (Schreiber *et al.*, 1997 ; Schreiber *et al.*, 1999). Cette interaction implique là aussi le domaine NBD1 (Schreiber *et al.*, 2000).

De même, CFTR semble réguler l'AQP9 (Cheung *et al.*, 2003), et il co-localise avec les AQP1 et AQP5 (Burghardt *et al.*, 2003).

## 6- Les canaux chlorures calcium-dépendants

Les canaux chlorures activés par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont regroupés sous le terme CaCC (Ca<sup>2+</sup>-activated Chloride Channels) mais les acteurs protéiques de cette famille et les gènes impliqués ne sont pas connus. Ils sont impliqués dans le contrôle du volume du liquide muco-ciliaire (Tarran *et al.*, 2002). Les canaux CaCC sont activés *via* les récepteurs purinergiques par les nucléotides présent au niveau apical des cellules (Paradiso *et al.*, 2001). Par contre, leur activité est réduite en présence de CFTR et cette inhibition est encore plus marquée suite à l'activation de CFTR (Kunzelmann *et al.*, 1997 ; Wei *et al.*, 1999). Cette régulation négative nécessite le domaine cytosolique R de CFTR mais pas les séquences d'interaction avec les motifs PDZ (Wei *et al.*, 2001).

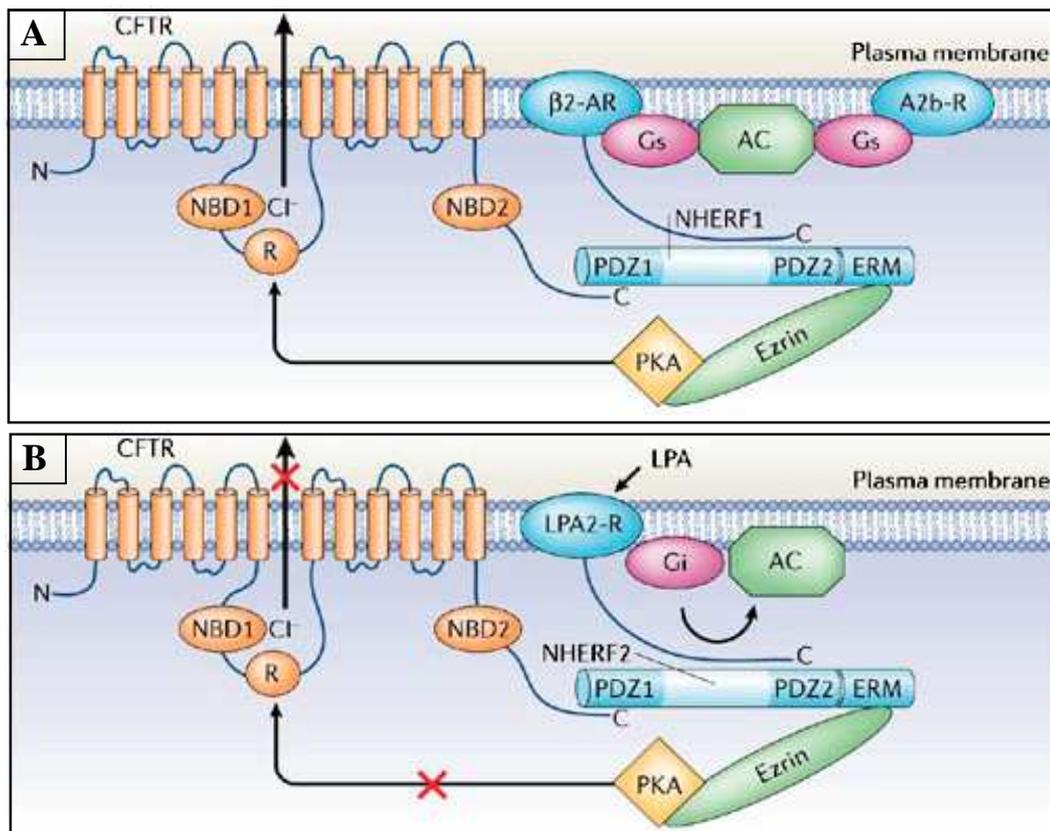
Les CaCC semblent également régulés pas ENaC et des canaux potassiques (Wang *et al.*, 2001 ; Mall *et al.*, 2003).

## 7- Les jonctions de type gap

Le processus inflammatoire tend à réduire les échanges inter-cellulaires par les jonctions communicantes (jonctions de type gap) dans l'épithélium sain mais pas dans l'épithélium mucoviscidose (Chanson *et al.*, 2001). Dans ce sens, il est rapporté que CFTR est capable d'interagir avec différentes protéines constitutives des jonctions gap telles que les connexines 40, 43 et 45 (Huang *et al.*, 2003 ; Kotsias & Peracchia, 2005, Kotsias *et al.*, 2006). Ce couplage fonctionnel entre CFTR et les connexines implique la tyrosine kinase c-Src (Huang *et al.*, 2003).

### 8- Autres protéines régulées par CFTR

NHE-RF1 et NHE-RF2 sont capables de lier CFTR à d'autres partenaires protéiques grâce à leurs domaines PDZ, favorisant d'éventuelles régulations réciproques. Ainsi, CFTR interagit par le biais de NHE-RF1 avec le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (Naren *et al.*, 2003) (Fig.29A) et, par le biais de NHE-RF2, avec le récepteur à l'acide lysophosphatidique de type 2 (LPA2-R) (Li C. *et al.*, 2005) (Fig.29B).



**Figure 29. Illustration de la formation de complexes multiprotéique autour de CFTR par l'intermédiaire de NHE-RF1/2 (d'après Guggino & Stanton, 2006).**

**A/** Complexe protéique d'interaction entre CFTR et le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique ( $\beta_2$ -AR) via NHE-RF1.

**B/** Complexe protéique d'interaction entre CFTR et le récepteur à l'acide lysophosphatidique (LPA2-R) via NHE-RF2.

Par conséquent, NHE-RF1 et NHE-RF2 sont des protéines adaptatrices permettant la constitution de divers complexes macromoléculaires autour de CFTR afin de faciliter les régulations réciproques entre les différents partenaires impliqués. Par ailleurs, NHE-RF1 est capable de s'oligomériser, ce qui augmente encore les possibilités d'assemblage de complexes macromoléculaires. Cette faculté d'oligomérisation s'effectue par interaction entre les domaines PDZ et nécessite la phosphorylation par la PKC (Fouassier *et al.*, 2000 ; Fouassier *et al.*, 2005 ; Lau & Hall, 2001).

### 3- Autres fonctions de CFTR

#### 1- Régulation du trafic vésiculaire et de la fusion des endosomes

L'internalisation, le trafic et le recyclage de CFTR peuvent être perturbés lors de mutations de la protéine. Mais les dysfonctions de CFTR peuvent également affecter de manière générale les processus d'endocytose et de fusion membranaire.

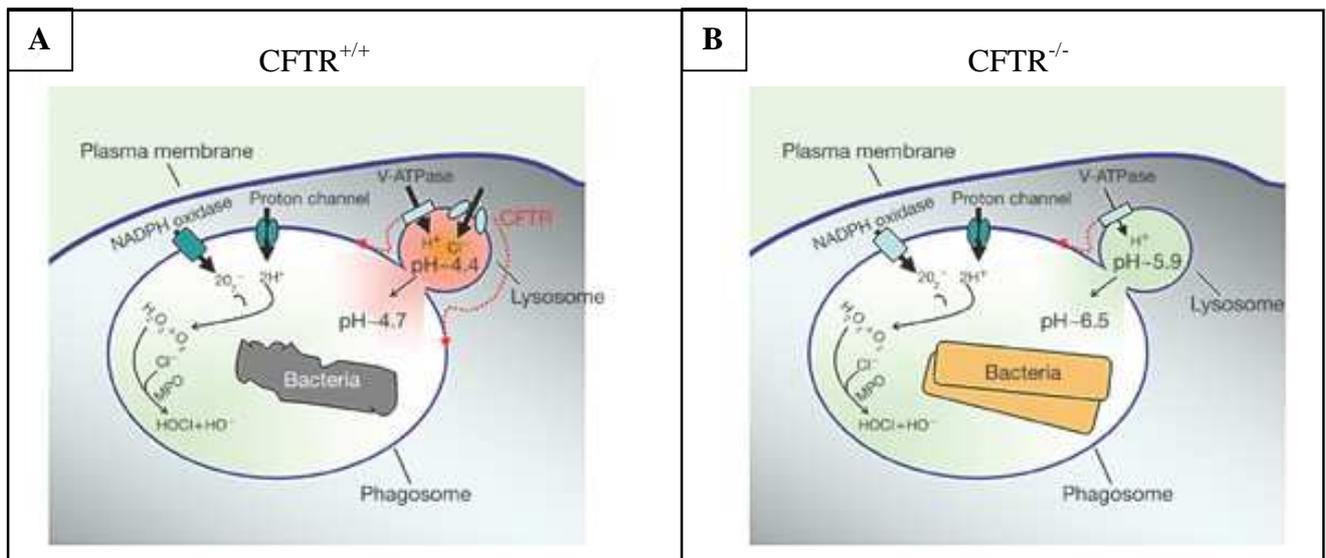
Cependant, CFTR n'est pas impliqué dans les processus de pinocytose (endocytose de phase liquide) (Spilmont *et al.*, 1996). Par contre, l'endocytose d'un récepteur suite à la fixation d'un ligand semble affectée dans la mucoviscidose et conduirait à une protéinurie des protéines à faible poids moléculaire déjà observée chez certains patients (Jouret *et al.*, 2007).

La mucoviscidose peut également affecter la sécrétion vésiculaire ATP-dépendante de mucus au moins dans certains organes comme le pancréas (Montserrat *et al.*, 1996).

Par ailleurs, l'expression et l'activation de CFTR favorisent la fusion des endosomes entre eux (Biversi *et al.*, 1996). Cet effet est dû à la conductance chlorure de CFTR car lorsque celle-ci est abolie en remplaçant les ions  $\text{Cl}^-$  par du gluconate, la fusion des endosomes n'est plus augmentée.

#### 2- Régulation du pH intracellulaire

La mucoviscidose conduit à des anomalies de pH dans les organelles intracellulaires où ce dernier est plus basique dans les cellules affectées en comparaison aux cellules issues de patients sains (Barasch *et al.*, 1991 ; Elgavish, 1991). Le pH cellulaire peut être influencé de manière générale par la relation de régulation qui lie CFTR et les échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  de la famille SLC26. Mais plus précisément, CFTR joue un rôle dans l'acidification des organelles intracellulaires. Cette fonction prend son importance lors d'une invasion bactérienne. En effet, dans les macrophages, les phagosomes contenant les bactéries phagocytées par la cellule fusionnent avec des lysosomes pour former un phagolysosome où ces bactéries sont détruites par l'acidité et les enzymes de lyse dont l'activité est optimale à pH acide. Or l'acidification des lysosomes dépend, au moins en partie, de CFTR. Dans les cellules mucoviscidosiques, les bactéries phagocytées ne sont pas lysées et continuent même de proliférer dans les phagolysosomes des macrophages (Di *et al.*, 2006) (Fig.30). Cependant, une controverse a récemment vu le jour par publication d'un article indiquant que l'acidification lysosomale serait indépendante de CFTR (Haggie & Verkman, 2007).



**Figure 30. Phagocytose bactérienne par une cellule saine (A) et une cellule mucoviscidique (B) (d'après Di *et al.*, 2006).**

Le même processus de digestion bactérienne semble avoir lieu dans les cellules épithéliales où *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* persistent dans les épithélia mucoviscidiques, alors qu'ils sont contenus en vésicules dans les épithélia sains (Jarry & Cheung, 2006 ; Kong *et al.*, 2006). D'ailleurs, *S. Aureus* envahit même le cytoplasme des cellules mucoviscidiques 4 heures après l'infection (Jarry & Cheung, 2006). En outre, *P. aeruginosa* sécrète un facteur de virulence, la pyocyanine, qui inhibe l'activité de la V-ATPase, une pompe à proton contribuant à l'acidification des lysosomes, conduisant à une diminution d'expression de CFTR (Kong *et al.*, 2006).

### 3- Rôle dans l'infection/inflammation

De par son rôle potentiel dans l'acidification des compartiments intracellulaire nécessaire à l'élimination des bactéries, CFTR prendrait indirectement une fonction dans le système immunitaire et dans le processus d'infection/inflammation observé chez les patients. Il faut ajouter à cela le rôle de récepteur que joue CFTR pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhi* (Pier *et al.*, 1997 ; Pier *et al.*, 1998). Par ailleurs, il vient d'être mis en évidence l'implication de CFTR dans la mise en place de la réaction immunitaire contre l'invasion par *P. aeruginosa*. En effet, lors d'une infection par *P. aeruginosa*, la protéine MVP (Major Vault Protein, appelée aussi Lung Resistance-related Protein LRP), principal constituant des complexes ribonucléoprotéiques cytosoliques, est recrutée vers des rafts

membranaires lipidiques où se trouve également CFTR (Kowalski *et al.*, 2004 ; Kowalski *et al.*, 2007). Ce recrutement est maximal lorsque *P. aeruginosa* se lie à CFTR provoquant l'internalisation de la bactérie ainsi que l'activation du facteur nucléaire NFκB. Cela peut finalement conduire à l'apoptose de la cellule infectée et l'élimination bactérienne (Schroeder *et al.*, 2002 ; Cannon *et al.*, 2003). Ces processus cellulaires en réponse à l'infection sont associées à une meilleure résistance à *P. aeruginosa*. Dans la mucoviscidose, l'absence fonctionnelle de CFTR bouleverse cette cascade de réactions initiant la réponse immunitaire innée précoce, conduisant alors à l'échec de l'éradication de *P. aeruginosa* des voies respiratoires.

## V- CFTR ET RÉGULATION $\beta$ -ADRÉNERGIQUE

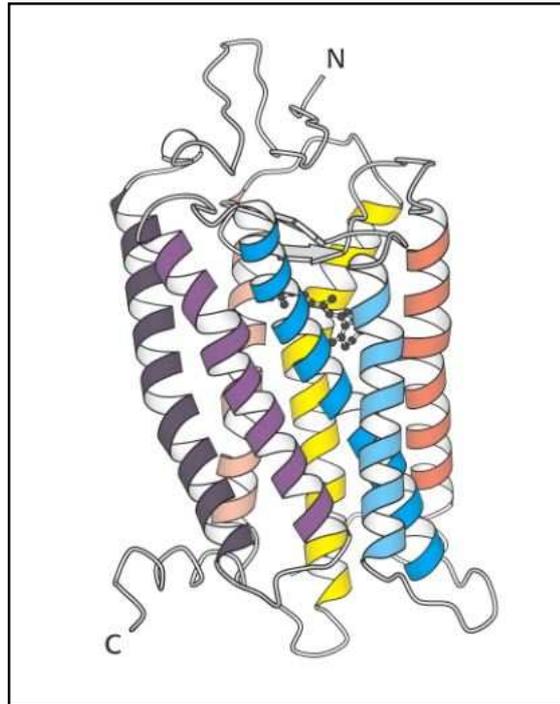
Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR) ont d'abord été classés en deux sous-groupes,  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , qui se distinguent par leur réponse aux différents agonistes et antagonistes (Lands *et al.*, 1967). Cependant, une réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique globale subsistait en présence d'antagonistes spécifiques des  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR, remettant en cause la classification en seulement deux sous-groupes (Ahrén & Lundquist, 1981). Le clonage des  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR a été réalisé environ 20 ans après leur classification (Dixon *et al.*, 1986 ; Frielle *et al.*, 1987). Puis, la même année que CFTR, un troisième sous-type de  $\beta$ -AR a été cloné (Emorine *et al.*, 1989).

Les  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR sont connus pour être exprimés dans les poumons humains, avec une forte prédominance du sous-type  $\beta_2$  (Carstairs *et al.*, 1985 ; Hamid *et al.*, 1991 ; Mak *et al.*, 1994). Par contre, la présence du  $\beta_3$ -AR dans les voies aériennes n'a jamais été décrite chez l'Homme, mais elle a été suggérée dans certains modèles animaux.

### 1- Les récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques

#### 1- Structure des gènes et des protéines $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques

Les gènes des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques sont localisés respectivement sur les chromosomes 10 et 5 (Frielle *et al.*, 1987 ; Kobilka *et al.*, 1987a), et ils ne comportent pas d'intron (Kobilka *et al.*, 1987b ; Yang-Feng *et al.*, 1990). L'ARNm du  $\beta_1$ -AR fait 2,5 kb et code pour une protéine de 477 acides aminés (Frielle *et al.*, 1987). Le transcrit du  $\beta_2$ -AR a une longueur de 2,2 kb et code une protéine de 413 acides aminés (Kobilka *et al.*, 1987b). L'analyse des séquences a révélé 54% d'homologie entre ces deux récepteurs (Frielle *et al.*, 1987) et a permis de les identifier comme des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Fig.31).



**Figure 31. Représentation tridimensionnelle d'un récepteur à 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires (d'après <http://oregonstate.edu/instruction/bb450/stryer/ch15/Slide11.jpg>).**

N : extrémité N-terminale extracellulaire.

C : extrémité C-terminale cytosolique.

Les séquences les plus conservées entre ces deux récepteurs sont localisées au niveau des hélices  $\alpha$  transmembranaires et des boucles cytosoliques. De même, pour chacun des deux sous-types, ces régions sont très conservées entre espèces (Frielle *et al.*, 1987 ; Kobilka *et al.*, 1987a).

## 2- Voies de signalisation $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques

Les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques sont tous les deux couplés à la protéine trimérique  $G_s$  (Hekman *et al.*, 1984 ; Cerione *et al.*, 1984b ; Chung *et al.*, 1988) La fixation d'un agoniste sur ces récepteurs provoque la fixation d'une molécule de GTP sur la sous-unité  $\alpha_s$  de  $G_s$ . La sous-unité  $\alpha_s$  est alors capable de stimuler la formation d'AMPc par l'adénylate cyclase. L'accumulation intracellulaire d'AMPc entraîne l'activation de la PKA, initiatrice de la réponse cellulaire. Cette réponse varie selon les types cellulaires. L'interaction avec les protéines  $G_s$  implique essentiellement les trois premières boucles intracellulaires. En effet, des

peptides de synthèse correspondant aux première et deuxième boucles cytosoliques du  $\beta_1$ -AR ont un effet inhibiteur sur  $G_s$ , alors qu'un peptide correspondant à la région C-terminale de la troisième boucle intracellulaire a un effet activateur (Palm *et al.*, 1989). De même, pour le  $\beta_2$ -AR, les régions N et C-terminales de la troisième boucle intracellulaire sont capables de stimuler  $G_s$  (Cheung *et al.*, 1991 ; Okamoto *et al.*, 1991).

Par ailleurs, la troisième boucle intracellulaire du  $\beta_2$ -AR est également capable d'activer faiblement  $G_i$ . Par contre, lorsqu'elle est phosphorylée par la PKA, sa capacité à activer  $G_s$  est fortement diminuée alors que sa capacité à activer  $G_i$  est augmentée (Okamoto *et al.*, 1991). L'interaction du  $\beta_2$ -AR avec  $G_i$  a également été décrite en cellules natives (Communal *et al.*, 1999 ; Kuschel *et al.*, 1999 ; Xiao *et al.*, 1999), mais une telle interaction n'a jamais été décrite pour le  $\beta_1$ -AR. La protéine trimérique  $G_i$ , à l'inverse de  $G_s$ , inhibe l'adénylate cyclase. Mais elle peut également recruter une voie de signalisation intracellulaire. La phosphorylation par la PKA de la troisième boucle intracellulaire du  $\beta_2$ -AR est donc un mécanisme modulateur qui détermine le choix entre l'effet activateur et l'effet inhibiteur du récepteur activé.

En outre, les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  des protéines  $G_i$  peuvent également transduire un signal. Ainsi, selon le type cellulaire étudié, ces sous-unités sont capables d'activer des canaux ioniques (Lim *et al.*, 1995 ; Viard *et al.*, 2001) soit directement, soit en activant d'autres messagers intracellulaires comme la protéine G monomérique Ras, la PI3K, la PKC et Akt (Bommakanti *et al.*, 2000 ; Chesley *et al.*, 2000 ; Schmitt & Storck, 2002 ; Viard *et al.*, 2001). La protéine Akt est une kinase, aussi appelé protéine kinase B, impliquée dans la régulation de l'apoptose. Mais cette voie de régulation semble spécifique au  $\beta_2$ -AR et est absente pour le  $\beta_1$ -AR, expliquant par exemple que seule l'activation spécifique des  $\beta_2$ -AR active un courant calcique et a un effet protecteur anti-apoptotique dans les cellules cardiaques myocytaires (Chesley *et al.*, 2000 ; Viard *et al.*, 2001). La figure 32 représente les voies de signalisation impliquées lors des stimulations  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques.

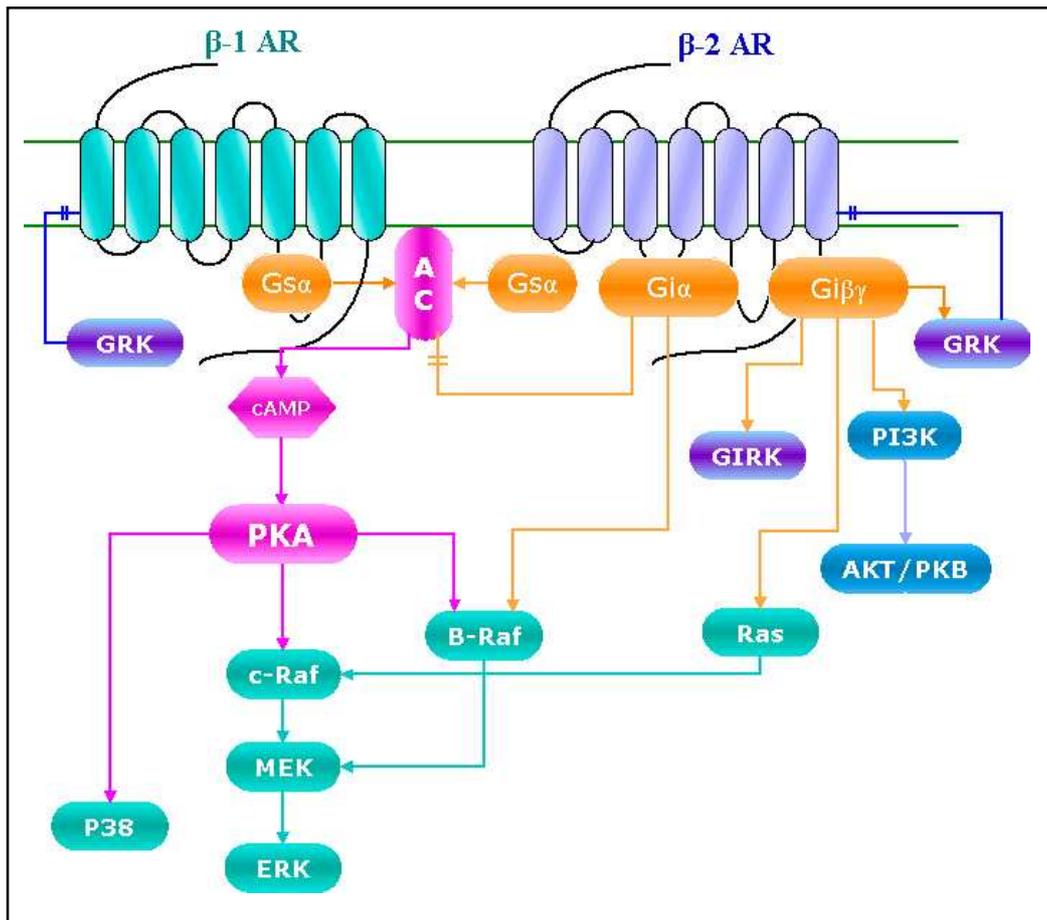
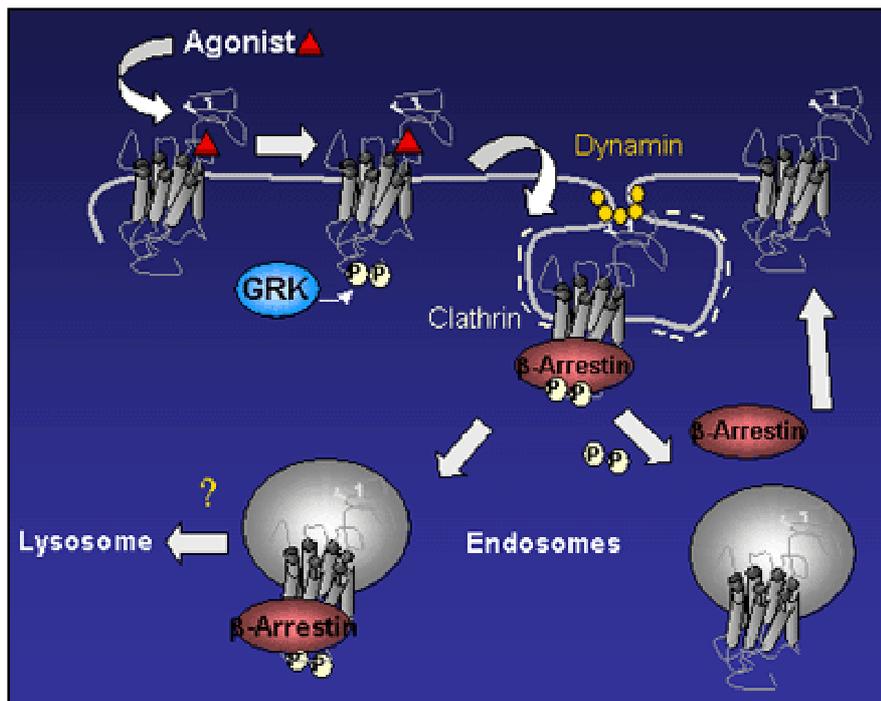


Figure 32. Voies de signalisation  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques.

(d'après [http://arab.bjmu.edu.cn/image/signal/beta\\_pathway\\_noncanonical.gif](http://arab.bjmu.edu.cn/image/signal/beta_pathway_noncanonical.gif))

### 3- Régulation de l'expression des récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques

Comme la plupart des récepteurs couplés aux protéines G, les  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR ont la caractéristique d'être sensibles au phénomène de désensibilisation lors de la stimulation prolongée par un agoniste (Mukherjee & Lefkowitz, 1976) (Fig.33). Cet effet est initié par la phosphorylation du récepteur par la kinase des  $\beta$ -AR ( $\beta$ -ARK aussi appelée GRK2 : G protein coupled Receptor Kinase) qui permet alors la liaison du récepteur à la  $\beta$ -arrestine (Pipping *et al.*, 1993). La  $\beta$ -arrestine sert de protéine adaptatrice pour la liaison à la protéine AP-2 constitutive des manteaux de clathrine et ainsi permettre la formation de vésicules d'endocytose (Goodman *et al.*, 1996 ; Laporte *et al.*, 1999) (Fig.33). D'ailleurs, les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  des protéines G trimériques interagissent directement avec la  $\beta$ -ARK facilitant ainsi le processus d'internalisation (Pitcher *et al.*, 1992). De plus, la  $\beta$ -ARK fait la liaison entre le récepteur à internaliser et le cytosquelette. En effet, la  $\beta$ -ARK interagit avec les microtubules par liaison à la tubuline (Pitcher *et al.*, 1998).



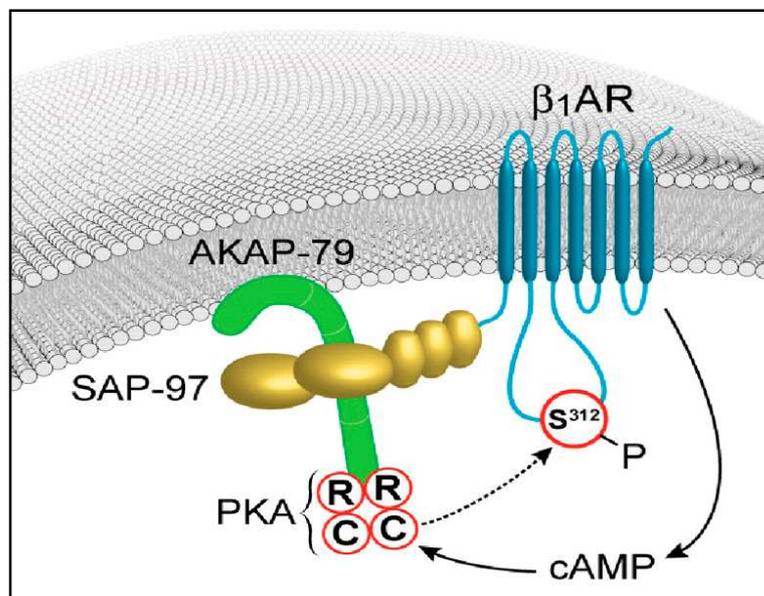
**Figure 33. Mécanisme d'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G (d'après <http://www.mapageweb.umontreal.ca/bouvier/research/RegSign.html>)**

GRK : kinase des récepteurs couplés aux protéines G.

La désensibilisation, au moins pour le  $\beta_1$ -AR, peut également être initiée par la phosphorylation par la PKA, ce qui conduit à une endocytose *via* des cavéoles (Rapacciuolo *et al.*, 2003).

L'endocytose du  $\beta_2$ -AR peut également résulter de son ubiquitinylation et celle de la  $\beta$ -arrestine par une ubiquitine ligase (Shenoy *et al.*, 2001). D'ailleurs, le  $\beta_2$ -AR semble être plutôt multi-ubiquitinylé pour son internalisation car la mono-ubiquitinylation présente une affinité trop faible vis-à-vis des protéines adaptatrices de la clathrine et ne permet pas l'endocytose (Barriere *et al.*, 2006). En revanche, l'endocytose du  $\beta_1$ -AR n'est pas régulée par ubiquitinylation (Liang & Fishman, 2004). Le  $\beta_1$ -AR interagit avec différents partenaires à domaines PDZ qui déterminent sa stabilité à la membrane ou son internalisation. Ainsi, l'extrémité C-terminale du  $\beta_1$ -AR interagit avec les domaines PDZ des protéines PSD-95 (Post Synaptic Density Protein of 95 kDa) (Hu *et al.*, 2000), Magi-2 (membrane-associated guanylate kinase inverted-2) (Xu *et al.*, 2001), GIPC (GAIP-interacting protein, carboxyl terminus) (Hu *et al.*, 2003), MAGI-3 et SAP-97 (synapse associated protein of 97 kDa) (He *et al.*, 2005). Les conséquences de ce type d'interaction varient selon le partenaire à domaines PDZ avec lequel le  $\beta_1$ -AR interagit. Ainsi, PSD-95 stabilise le  $\beta_1$ -AR à la membrane apicale

(Hu *et al.*, 2000) alors que l'interaction avec MAGI-2 est renforcée par les agonistes  $\beta_1$ -AR et favorise l'internalisation du récepteur (Xu *et al.*, 2001). Par ailleurs, SAP-97 semble favoriser plutôt le recyclage du  $\beta_1$ -AR à la membrane (Gardner *et al.*, 2007). SAP-97 permet la formation d'un complexe macromoléculaire de régulation du  $\beta_1$ -AR en fixant une protéine d'ancrage de la PKA, AKAP-79 (protein kinase A anchoring protein of 79 kDa). Ce complexe faciliterait ainsi la phosphorylation par la PKA du  $\beta_1$ -AR sur la sérine 312 pour favoriser le recyclage de ce récepteur (Gardner *et al.*, 2007) (Fig.34). Le  $\beta_1$ -AR a tout de même un partenaire à domaines PDZ en commun avec CFTR. Il s'agit de CAL qui, comme pour CFTR, retient le  $\beta_1$ -AR dans la cellule. Cette interaction inhibitrice de la localisation apicale du  $\beta_1$ -AR est levée par compétition avec PSD-95 (He *et al.*, 2004).



**Figure 34. Complexe macromoléculaire constitué du récepteur  $\beta_1$ -adrénergique, de SAP-97, de AKAP-79 et de la PKA (d'après Gardner *et al.*, 2007).**

$\beta_1$ AR : récepteur  $\beta_1$ -adrénergique ; cAMP = AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; PKA : protéine kinase AMPc-dépendante ; R : sous-unité régulatrice de la PKA ; C : sous-unité catalytique de la PKA ; AKAP-79 : protéine d'ancrage de la PKA de 79 kDa ; SAP-97 : protéine de 97 kDa associée aux synapses ; S<sup>312</sup> : sérine en position 312.

L'internalisation des récepteurs les mène vers les endosomes où ils peuvent être ensuite recyclés à la membrane ou dégradés par les lysosomes. Une étude récente démontre que l'internalisation des  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR peut être prévenue par nitrosylation de résidus cystéine de la  $\beta$ -ARK (Whalen *et al.*, 2007), renforçant ainsi la complexité des mécanismes de régulation de l'endocytose de ces récepteurs.

#### 4- Rôles physiologiques des récepteurs $\beta_1$ et $\beta_2$ -adrénergiques dans l'appareil respiratoire

La stimulation  $\beta_1$  et/ou  $\beta_2$ -adrénergique régule diverses fonctions physiologiques pulmonaires. Elle permet notamment la bronchodilatation par l'intermédiaire des muscles lisses bronchiques. Elle favorise également la clairance muco-ciliaire en augmentant la fréquence des battements ciliaires (Camner *et al.*, 1976 ; Wong *et al.*, 1988). De plus, elle est impliquée dans la régulation de processus immunitaires en diminuant l'expression de certaines molécules d'adhésion de l'épithélium respiratoire, limitant ainsi le recrutement et l'activation de lymphocytes, notamment des polynucléaires neutrophiles (Oddera *et al.*, 1998). En revanche, elle augmente l'adhérence à l'épithélium bronchique des monocytes/macrophages par un mécanisme impliquant la PKA (Romberger *et al.*, 2000). En outre, les agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques préservent l'intégrité de l'épithélium face aux agressions bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* et *Haemophilus influenzae*, notamment en empêchant la dégradation des jonctions serrées entre cellules adjacentes (Dowling *et al.*, 1997 ; Dowling *et al.*, 1998 ; Coraux *et al.*, 2004).

En outre, la stimulation  $\beta$ -adrénergique joue un rôle prépondérant dans la régulation des transports électrolytiques au niveau de l'épithélium respiratoire, et leur fonction est altérée dans la mucoviscidose. Avant même l'identification du gène *CFTR*, des dysfonctions du système nerveux autonome étaient décrites dans la mucoviscidose, se manifestant en particulier par une hypo-réactivité aux stimulations  $\beta$ -adrénergiques (Davis *et al.*, 1978). Il avait d'ailleurs été constaté que la stimulation  $\beta$ -adrénergique provoque une activité chlorure apicale dans les épithélia sains mais pas dans les épithélia mucoviscidosiques (Frizzell *et al.*, 1986). Pourtant les voies de signalisation intracellulaire activant l'adénylate cyclase *via* les protéines G sont intactes (Widdicombe, 1986).

Le  $\beta_2$ -AR joue un rôle important dans la régulation de la clairance électrolytique de l'épithélium respiratoire (Sakuma *et al.*, 1994 ; Sakuma *et al.*, 1997), et cette fonction implique notamment *CFTR* (Mutlu *et al.*, 2005). En effet, la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique active la conductance chlorure de *CFTR*, et cet effet est exacerbé par la sur-expression de l'adénylate cyclase ou de la protéine effectrice  $G_s$  (Uezono *et al.*, 1993). Par ailleurs, cette activation nécessite des concentrations en agoniste  $\beta_2$ -adrénergique 100 à 1000 fois inférieures à celles produisant une augmentation détectable d'AMPc (Uezono *et al.*, 1993), suggérant un mécanisme d'activation directe ou une élévation très localisée du taux d'AMPc.

Or, comme illustré Fig.29A, le  $\beta_2$ -AR et CFTR sont liés par NHE-RF1 pour former un complexe macromoléculaire (Naren *et al.*, 2003). Par conséquent, la stimulation du  $\beta_2$ -AR entraîne, *via*  $G_s$  et l'adénylate cyclase, la formation d'AMPc qui active CFTR par l'intermédiaire de la PKA, toutes ces protéines se trouvant dans le même complexe multiprotéique. Mais la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique a également un effet sur l'expression de CFTR par une voie indépendante de l'AMPc. En effet, elle augmente le taux protéique de CFTR dans la cellule sans modifier son taux d'ARNm (Taouil *et al.*, 2003). De plus, elle favorise la liaison entre CFTR et NHE-RF1 (Taouil *et al.*, 2003). Malgré les effets de la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique sur le transport électrolytique, le récepteur ne semble pas impliqué dans la clairance du fluide alvéolaire en situation normale, mais il devient essentiel pour l'adaptation physiologique nécessaire à l'évacuation du fluide en excès dans le poumon endommagé (Mutlu *et al.*, 2004).

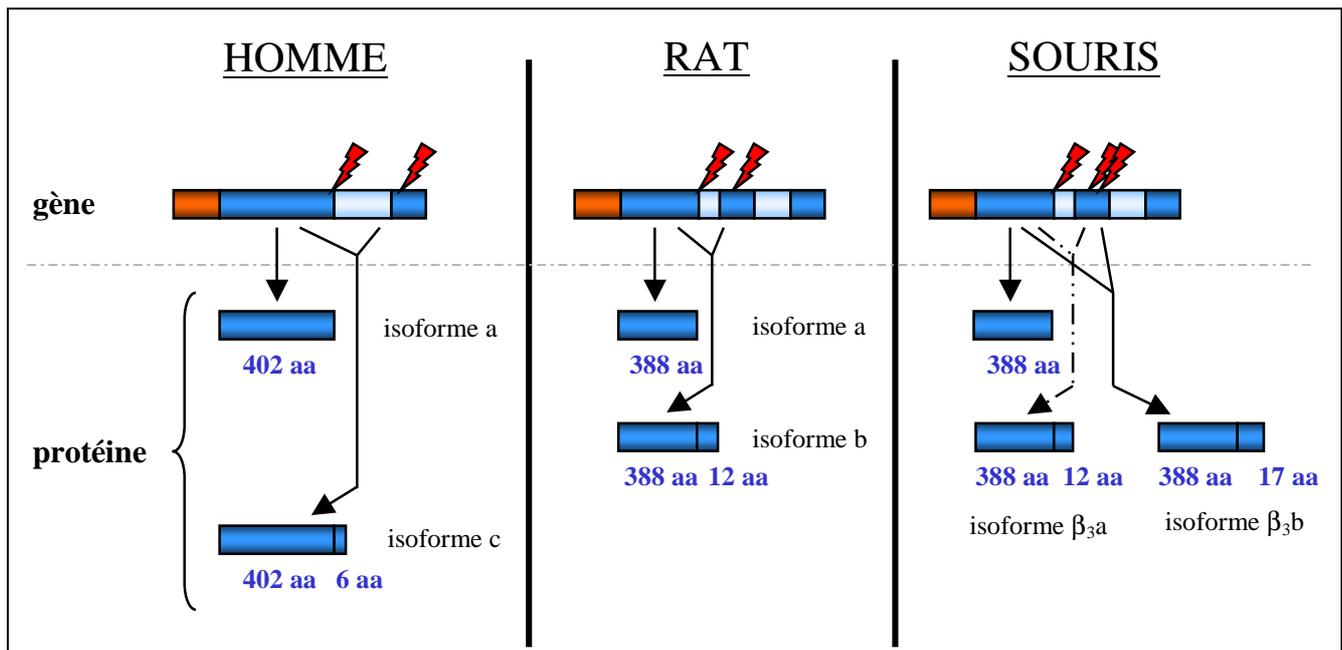
En ce qui concerne le  $\beta_1$ -AR, il semble peu impliqué dans les transports électrolytiques respiratoires chez l'Homme, même s'il active la clairance du fluide alvéolaire chez le rat (Sakuma *et al.*, 2001). Malgré les multiples partenaires à domaines PDZ du  $\beta_1$ -AR, aucune interaction physique entre CFTR et le  $\beta_1$ -AR n'est décrite. Néanmoins, la stimulation  $\beta_1$ -adrénergique est capable d'activer CFTR au moins chez le rat, mais aussi ENaC, ce qui conduit à l'augmentation de la clairance du fluide alvéolaire (Gu *et al.*, 2006 ; Sakuma *et al.*, 2001).

## 2- Le récepteur $\beta_3$ -adrénergique

### 1- Structure du gène

Le gène du  $\beta_3$ -AR humain est localisé sur le chromosome 8 et a été cloné en 1989 à partir d'une banque d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) génomique humain (Emorine *et al.*, 1989). Ce gène a d'abord été considéré comme étant sans intron, comme le sont ceux des deux autres sous-type de  $\beta$ -AR. Mais l'analyse de séquences d'ADN complémentaire a révélé la présence de sites de clivage par des enzymes de restriction, suggérant la présence d'au moins un intron (Granneman *et al.*, 1992). L'épissage alternatif ainsi mis en évidence aboutit à la traduction d'une protéine plus longue de 6 acides aminés (Fig.35). Ainsi le gène du  $\beta_3$ -AR humain est constitué de deux exons et un intron. Le premier exon code les 402 premiers acides aminés de la protéine, et le second exon code les 6 acides aminés supplémentaires. Le

second exon contient aussi les séquences de la région 3' non traduite (Van Spronsen *et al.*, 1993) (Fig.35). Cependant, une analyse par homologie de séquence avec le gène  $\beta_3$ -AR de rat a suggéré une structure à trois exons et deux introns (Lelias *et al.*, 1993). Mais le site d'épissage suspecté, situé dans l'unique intron du gène humain et correspondant au second exon et second intron chez le rat, n'est pas utilisé chez l'Homme (Granneman *et al.*, 1993).



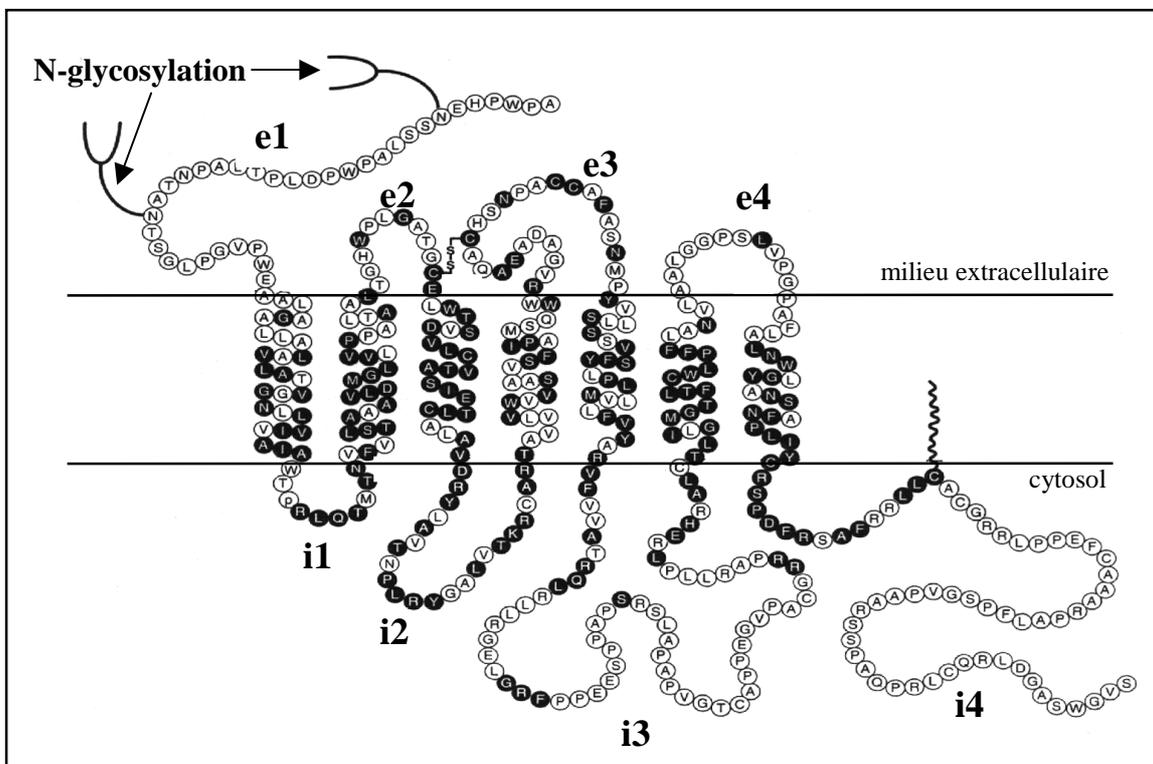
**Figure 35. Schéma du gène du récepteur  $\beta_3$ -adrénérique et structure des isoformes protéiques obtenues après épissage alternatif chez l'Homme, le rat et la souris.**

**Légende :** ■ promoteur ■ exon ■ intron ⚡ codon stop

Par ailleurs, le promoteur du  $\beta_3$ -AR possède quatre sites de réponse à l'AMPC (CRE : cAMP responsive element) (Liggett & Schwinn, 1991). La fixation d'un facteur de transcription CREB (CRE binding protein) sur ces domaines CRE entraîne la stimulation ou l'inhibition de la transcription du gène. Ainsi, l'exposition prolongée à un agoniste peut augmenter le taux d'ARNm du  $\beta_3$ -AR de même que son expression protéique à la membrane, alors que celle des autres sous-types est diminuée (Thomas *et al.*, 1992). Trois des quatre éléments CRE du promoteur du gène  $\beta_3$ -AR, situés à 518, 622 et 1125 bases en amont du départ de la transcription, participent à cette augmentation de la transcription (Thomas *et al.*, 1992).

## 2- Structure de la protéine

Comme les sous-types  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Ces domaines transmembranaires hydrophobes sont reliés entre eux par des boucles hydrophiles successivement intra et extracellulaires (Fig.36). L'extrémité C-terminale est cytosolique et possède un site de palmitoylation permettant son ancrage à la membrane. L'extrémité N-terminale est extracellulaire et porte deux sites de glycosylation. Un pont disulfure entre la cystéine 110 de la boucle extracellulaire e2 et la cystéine 189 de la boucle e3 pourrait être impliqué dans la fixation des ligands, comme c'est le cas pour le  $\beta_2$ -AR (Dixon *et al.*, 1987) (Fig.36).



**Figure 36. Structure primaire du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique humain (d'après Strosberg, 1997).**

Les résidus mentionnés dans des cercles noirs sont communs aux trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Les quatre boucles extracellulaires sont indiquées de e1 à e4. Les quatre boucles intracellulaires sont mentionnées i1 à i4.

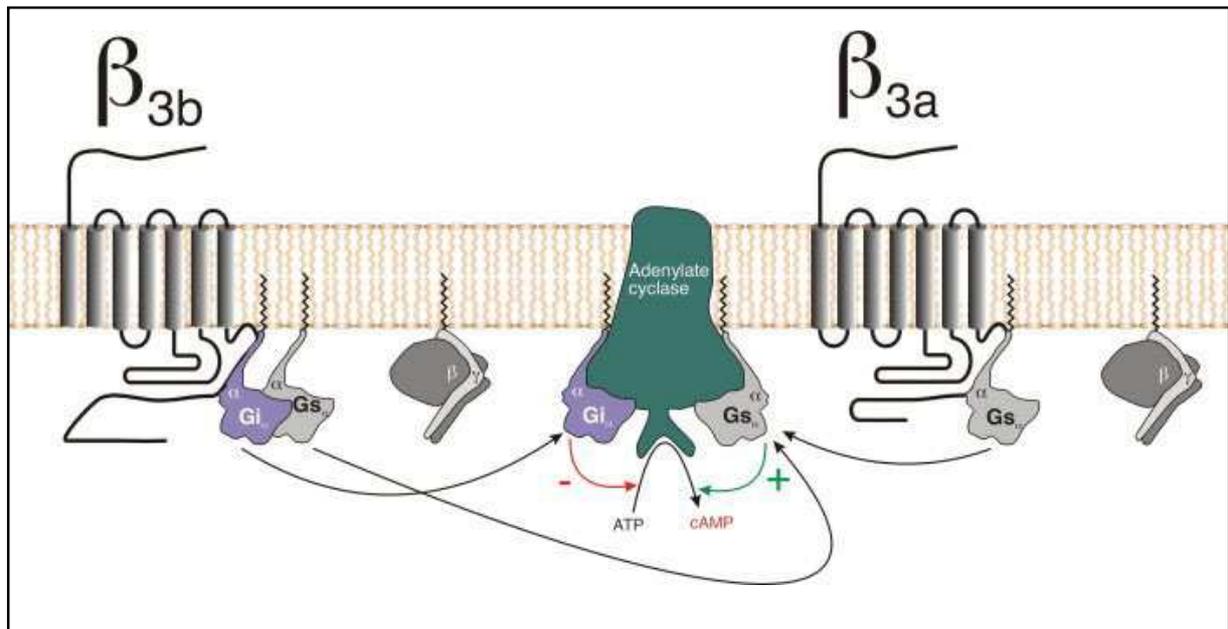
La séquence en acides aminés du  $\beta_3$ -AR humain présente 51 et 49 % d'homologie avec les  $\beta_1$ -AR et  $\beta_2$ -AR respectivement. Les résidus conservés entre les trois sous-types de récepteurs se situent principalement au niveau des domaines transmembranaires et des régions des boucles intracellulaires proches de la membrane (Fig.36). En revanche, la région centrale de la boucle i3 et l'extrémité C-terminale sont peu conservées. Elles sont impliquées dans les interactions avec les protéines cytosoliques et déterminent la spécificité des protéines partenaires de chaque sous-type, notamment l'interaction avec le type de protéine G trimérique (Hall *et al.*, 1999).

Contrairement aux deux autres sous-types, la boucle i3 et l'extrémité C-terminale du  $\beta_3$ -AR ne contiennent pas de séquences consensus de phosphorylation par la PKA ou par la  $\beta$ -ARK (Emorine *et al.*, 1989). Cela expliquerait la résistance de ce récepteur à la désensibilisation.

### 3- Voies de signalisation

Différentes voies de signalisation ont été décrites dans divers tissus. Le tissu le plus étudié reste néanmoins la graisse du fait de la forte expression du  $\beta_3$ -AR. Comme les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques, le  $\beta_3$ -AR peut se coupler à une protéine  $G_s$  qui active l'adénylate cyclase pour induire une augmentation d'AMPc (Emorine *et al.*, 1989).

Par ailleurs, des études dans les adipocytes de souris ont démontré que le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique est aussi couplé à  $G_{i/0}$  (Chaudhry *et al.*, 1994). Ainsi, la toxine pertussique (PTX) inhibe  $G_{i/0}$ , ce qui augmente le taux d'AMPc induit par la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique. Le couplage du  $\beta_3$ -AR à  $G_{i/0}$  limite donc l'activation de l'adénylate cyclase par  $G_s$ . Chez l'Homme, le couplage du  $\beta_3$ -AR avec  $G_{i/0}$  a également été mis en évidence au niveau du muscle cardiaque où la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique active la production de monoxyde d'azote (NO) pour conduire à une diminution de la force de contraction du cœur (effet inotrope négatif) (Gauthier *et al.*, 1996 ; Gauthier *et al.*, 1998). De même, dans une lignée épithéliale alvéolaire humaine exprimant l'isoforme humaine  $\beta_{3a}$ -AR après transfection, la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique recrute la protéine  $G_{i/0}$  (Robay *et al.*, 2005). Mais, le couplage du  $\beta_3$ -AR à  $G_{i/0}$  semble dépendre de l'isoforme impliquée. Ainsi, l'isoforme murine  $\beta_{3a}$  serait exclusivement liée à  $G_s$ , alors que l'isoforme  $\beta_{3b}$  serait liée soit à  $G_s$ , soit à  $G_{i/0}$  (Hutchinson *et al.*, 2002) (Fig.37).

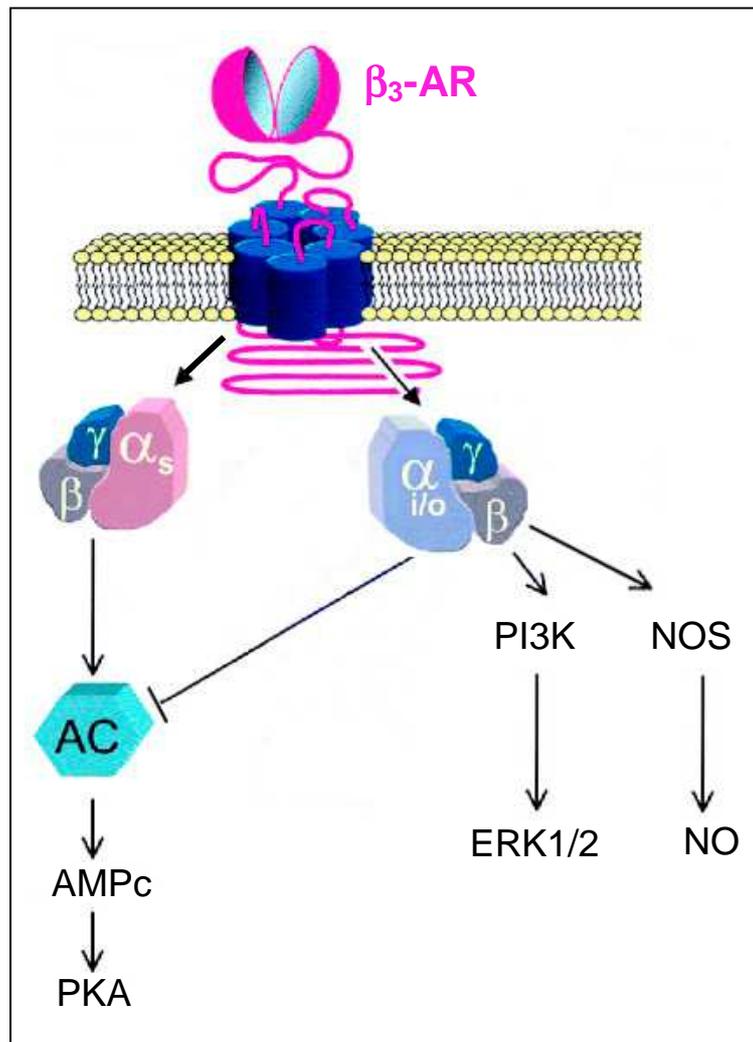


**Figure 37. Représentation de la divergence de couplage aux protéines G des deux isoformes murines du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique.**

(d'après [www.med.monash.edu.au/pharmacology/research/groups/summers.html](http://www.med.monash.edu.au/pharmacology/research/groups/summers.html)).

Cette différence de couplage des deux isoformes murines serait liée à la présence d'un résidu cystéine supplémentaire dans l'extrémité C-terminale de l'isoforme  $\beta_{3b}$ . Ce résidu est un second site potentiel de palmitoylation du récepteur, perturbant ainsi la conformation de la boucle i4 qui interagit avec les protéines G (Evans *et al.*, 1999). De plus, chez la souris, l'isoforme  $\beta_{3b}$  possède dans l'extrémité C-terminale deux résidus sérines consécutifs dont la mutation empêche le couplage à  $G_{i/0}$  (Sato *et al.*, 2005). Compte tenu de la complexité du gène du  $\beta_3$ -AR dans les différentes espèces, il n'a pas été décrit chez l'Homme d'isoforme similaire à ceux de la souris, même si les deux résidus sérines sont présents sur le  $\beta_3$ -AR humain.

La stimulation  $\beta_3$ -adrénergique est impliquée dans l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinases) de type ERK1 et ERK2 (extracellular signal-regulated kinase). En fonction des modèles cellulaires utilisés, cette activation peut dépendre des protéines  $G_s$  (Lindquist *et al.*, 2000 ; Mizuno *et al.*, 2000) ou  $G_{i/0}$  (Gerhardt *et al.*, 1999 ; Soeder *et al.*, 1999 ; Cao *et al.*, 2000). Mais l'activation de ERK1/2 par la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_s$  pour activer la voie adénylate cyclase – AMPc – PKA n'a été observée que dans des cellules murines. En revanche, la voie  $G_{i/0}$  – PI3K est recrutée dans des cellules humaines et implique les sous-unités  $\beta/\gamma$ . La figure 38 résume les voies de signalisation  $\beta_3$ -adrénergique impliquant les protéines G trimériques.



**Figure 38. Voies de signalisation du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique passant par les protéines G (modifié d'après Hermans & Challiss, 2001).**

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma_s$  et  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma_{i/o}$  sont les sous-unités formant les protéines  $G_s$  et  $G_{i/o}$  respectivement.

AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; PKA : protéine kinase AMPc-dépendante ; PI3K : phosphatidyl inositol triphosphate kinase ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; NO : monoxyde d'azote ; NOS : NO synthase.

En plus de la voie des protéines G, le  $\beta_3$ -AR peut activer ERK1/2 par la tyrosine kinase c-src (Lindquist *et al.*, 2000). Le recrutement de c-src se fait de façon directe car le  $\beta_3$ -AR se lie à c-src par des motifs riches en proline présents dans la boucle i3 et l'extrémité C-terminale (Cao *et al.*, 2000). Cette fixation de c-src dépend de la liaison de l'agoniste et est sensible à la PTX, indiquant que la protéine  $G_{i/o}$  est tout de même impliquée.

En outre, au niveau des vaisseaux de la rétine humaine, le  $\beta_3$ -AR semble promouvoir l'angiogenèse en stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales par la voie ERK1/2 (Steinle *et al.*, 2003 ; Steinle *et al.*, 2005).

L'activation de ERK1/2 par le  $\beta_3$ -AR semble exiger un ancrage de ce dernier au cytosquelette de la cellule. En effet, le  $\beta_3$ -AR peut se lier directement à la vimentine, constituant essentiel des filaments intermédiaires, la suppression de cette interaction empêchant l'activation de ERK1/2 (Kumar *et al.*, 2007).

Le couplage d'un récepteur à plusieurs protéines G et plusieurs voies de signalisation intracellulaire n'est pas spécifique au  $\beta_3$ -AR mais a déjà été décrit pour de nombreux récepteurs (Gudermann *et al.*, 1997). Le couplage du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique à une voie de signalisation semble dépendre de l'isoforme, du type cellulaire dans lequel le récepteur est exprimé, mais également de l'agoniste. Ainsi, le  $\beta_3$ -AR existerait sous plusieurs conformations : un ligand favorisant une conformation, et chaque conformation favorisant le couplage à une voie de signalisation (Gerhardt *et al.*, 1999). Cela a d'ailleurs été confirmé par le fait qu'un ligand peut être agoniste ou antagoniste selon le niveau d'expression du  $\beta_3$ -AR, et que deux ligands peuvent avoir un ordre d'efficacité inversé pour l'activation de la voie AMPc – PKA et pour la voie des MAPK (Sato *et al.*, 2007). Par ailleurs, le comportement pharmacologique du  $\beta_3$ -AR humain suggère qu'il possède, comme c'est le cas pour les  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -AR (Giudicelli *et al.*, 1984 ; Hoyer & Engel, 1983 ; Cerione *et al.*, 1984a ; Lang & Lemmer, 1985 ; Lacasa *et al.*, 1985), deux états présentant des affinités distinctes pour leurs ligands (Baker, 2005).

#### **4- Régulation de l'expression du récepteur $\beta_3$ -adrénergique**

L'expression du  $\beta_3$ -AR peut être régulée suite à l'exposition à un agoniste (régulation homologue) mais également par des facteurs indépendants des catécholamines (régulation hétérologue).

##### *Régulation homologue*

La régulation homologue du  $\beta_3$ -AR, si elle implique une augmentation d'AMPc, peut activer les séquences CRE du promoteur du gène et conduire à une augmentation des taux d'ARNm et de la protéine à la membrane (Thomas *et al.*, 1992). Mais le maintien de la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique ne conduit pas systématiquement à une augmentation d'expression. Ainsi dans le myomètre humain, une exposition de 15h à un agoniste  $\beta_3$ -

adrénergique ne modifie pas le taux de  $\beta_3$ -AR membranaire, ni la réponse de ce récepteur après cette incubation (Rouget *et al.*, 2004).

Cependant, une désensibilisation fonctionnelle peut avoir lieu sans diminuer l'expression membranaire du  $\beta_3$ -AR. Ainsi l'exposition prolongée à un agoniste  $\beta_3$ -adrénergique conduit à une diminution du taux protéique de la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_s$ , mais pas des autres types de protéine G (Chambers *et al.*, 1994). Par comparaison, pour le  $\beta_2$ -AR, le même effet est observé avec en plus une diminution du taux de  $\beta_2$ -AR. Par ailleurs, une autre étude a démontré que les sous-unités  $\alpha$  de la protéine  $G_s$  sont internalisées après stimulation prolongée des récepteurs couplés aux protéines G. Cette internalisation s'effectue *via* des rafts lipidiques qui ciblent ces sous-unités vers des vésicules spécifiques, différentes de celles qui contiennent les récepteurs (Allen *et al.*, 2005). Par conséquent, la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique prolongée peut modifier les voies de signalisation intracellulaires couplées au récepteur sans affecter son expression.

#### *Régulation hétérologue*

Divers facteurs, autres que les ligands du récepteur, régulent son expression. Les glucocorticoïdes ont été les premiers mis en évidence. En effet, la dexaméthasone qui est un glucocorticoïde de synthèse à activité anti-inflammatoire et immunosuppressive, régule négativement les taux d'ARNm et la densité membranaire du  $\beta_3$ -AR dans des cellules de tissu adipeux murin, mais pas chez l'Homme (Fève *et al.*, 1992 ; Granneman & Lahners, 1994). L'effet observé chez la souris impliquerait le récepteur intracellulaire aux glucocorticoïdes (Fève *et al.*, 1992). Le traitement systémique des souris à la dexaméthasone réduit fortement le taux d'ARNm du  $\beta_3$ -AR dans le tissu adipeux mais pas dans l'iléon ou le colon (Evans *et al.*, 1998). Cette régulation différentielle de la transcription  $\beta_3$ -adrénergique selon les tissus peut s'expliquer par les propriétés de la région promotrice du gène. En effet, le promoteur  $\beta_3$ -adrénergique possède des séquences GRE (Glucocorticoid Response Element) ainsi que des sites de réponse à des facteurs de transcriptions spécifiques des adipocytes (Van Spronsen *et al.*, 1993). La diminution d'expression induite par la dexaméthasone n'est pas spécifique au  $\beta_3$ -AR puisque les mêmes effets sont observés dans les adipocytes sur les  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs (Fève *et al.*, 1990).

L'insuline provoque également une diminution de la densité des  $\beta_3$ -ARs membranaires. Cet effet passe par une réduction spécifique des taux d'ARNm  $\beta_3$  mais pas  $\beta_1$ , ni  $\beta_2$ -adrénergiques (Fève *et al.*, 1994). Cette régulation agit spécifiquement sur la transcription et n'affecte pas la demi-vie des ARNm  $\beta_3$ -adrénergiques. Elle implique le récepteur membranaire à l'insuline et la PKC (Fève *et al.*, 1995). De même, il a été montré chez le rat que les variations plasmatiques d'insuline suite aux cycles jeûne/repas modulent le taux d'ARNm  $\beta_3$ -adrénergiques (Hadri *et al.*, 1997a). L'insuline permettrait ainsi de diminuer l'effet lipolytique des catécholamines, favorisant alors la lipogénèse.

La triiodothyronine (T3), une hormone thyroïdienne, exerce une régulation du  $\beta_3$ -AR différente selon le tissu. T3 entraîne une diminution des taux d'ARNm et de protéines du  $\beta_3$ -AR dans la graisse brune de rat, et une augmentation dans la graisse blanche (Rubio *et al.*, 1995). De même, dans une lignée cellulaire pré-adipocytaire de rat, T3 augmente l'expression du  $\beta_3$ -AR en agissant au niveau post-transcriptionnel. T3 permet en effet d'augmenter la stabilité des ARNm  $\beta_3$ -adrénergiques dans cette lignée (El Hadri *et al.*, 1996). L'effet de T3 sur le  $\beta_3$ -AR dans la graisse brune permet, en synergie avec les catécholamines, la régulation de la thermogénèse.

L'acide butyrique, un acide gras à chaîne courte, induit une diminution importante des transcrits et des protéines  $\beta_3$ -AR qui deviennent à peine détectables dans les adipocytes murins (Krief *et al.*, 1994).

Le TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ), cytokine inflammatoire, entraîne une réduction des ARNm et des protéines  $\beta_3$ -adrénergiques (Hadri *et al.*, 1997b). Cet effet a été confirmé chez la souris par l'étude de l'injection systémique d'une endotoxine bactérienne, le LPS (Lipopolysaccharide), sur l'expression adipocytaire du  $\beta_3$ -AR. Le LPS stimule la production de TNF $\alpha$  qui conduit à l'inhibition de transcription du  $\beta_3$ -AR (Berkowitz *et al.*, 1998).

Par ailleurs, le  $\beta_3$ -AR, avec le  $\beta_2$ -AR, est impliqué dans la perception de la douleur. En effet, l'inhibition de la COMT (Catéchol-O-MéthylTransférase), une enzyme qui métabolise les catécholamines, produit une sensibilité accrue à la douleur mécanique et thermique, et cet effet est contrecarré par l'administration simultanée d'antagonistes  $\beta_2$  et  $\beta_3$ -adrénergiques (Nackley *et al.*, 2007). Or, le récepteur de deux neuropeptides impliqués dans les modulations

de la douleur, est exprimé dans les adipocytes humains, et l'un de ces neuropeptides, le neuropeptide AF, est capable d'augmenter la quantité de transcrits  $\beta_2$ -AR et  $\beta_3$ -AR (Lefrere *et al.*, 2002).

### 5- Rôles physiologiques du récepteur $\beta_3$ -adrénergique

Le  $\beta_3$ -AR est impliqué, chez différentes espèces, dans divers processus physiologiques, tels que la thermogénèse et la lipolyse (Carlisle & Stock, 1991 ; Langin *et al.*, 1992 ; Zilberfarb *et al.*, 1997), la relaxation des muscles lisses intestinaux, de la vessie et du corps caverneux (Koike *et al.*, 1997 ; Fujimura *et al.*, 1999 ; Cirino *et al.*, 2003), l'angiogénèse par production de VEGF (Asano *et al.*, 1997) et par stimulation de la prolifération et migration des cellules endothéliales (Steinle *et al.*, 2003), la dilatation des artères pulmonaires et de l'aorte thoracique (Tamaoki *et al.*, 1998 ; Trochu *et al.*, 1999), la contraction du cœur (Gauthier *et al.*, 1996).

Il faut noter que la distribution tissulaire et les effets physiologiques varient selon les espèces. Dans le cœur, par exemple, l'ARNm codant pour le  $\beta_3$ -AR est présent chez l'Homme, le chien et le porc (Gauthier *et al.*, 1996 ; Gauthier *et al.*, 1999 ; McNeel & Mersmann, 1999) mais pas chez le rat (Evans *et al.*, 1996 ; Gauthier *et al.*, 1999).

Au niveau de l'appareil respiratoire, peu de travaux ont été réalisés sur la distribution et la fonction du  $\beta_3$ -AR. La présence fonctionnelle de ces récepteurs a néanmoins été étudiée dans les muscles lisses bronchiques. L'ajout d'agoniste  $\beta_3$ -adrénergique au niveau de muscles lisses bronchiques de chien provoque une broncho-relaxation (Tamaoki *et al.*, 1993b). En revanche, chez l'Homme, le mouton et le cobaye, les résultats sont moins tranchés. La bronchorelaxation observée pourrait être due à un effet non spécifique sur les  $\beta_2$ -AR (Martin *et al.*, 1994). Une étude plus récente démontre, au contraire, que chez l'Homme la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique inhibe la relaxation AMPc-dépendante par la voie des protéines  $G_i$  (Naline *et al.*, 2000).

Au niveau de l'épithélium respiratoire, la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique a d'abord été étudiée chez le furet où elle produit une augmentation de la sécrétion apicale d'albumine mais une diminution de la sécrétion de lysozyme (Webber & Stock, 1992). Par ailleurs, deux autres études réalisées chez le chien et le lapin, démontrent que les agonistes  $\beta_3$ -adrénergiques

stimulent la fréquence des battements ciliaires de l'épithélium bronchique (Takeyama *et al.*, 1993 ; Tamaoki *et al.*, 1993a). Plus récemment, la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique a été démontrée comme régulatrice du transport électrolytique au niveau de l'épithélium nasal de lapin (Danner *et al.*, 2001).

Parallèlement à ces résultats, quelques études ont cherché à détecter la présence de transcrits dans l'appareil respiratoire. Ainsi, des ARNm  $\beta_3$ -adrénergiques sont trouvés dans les poumons chez le porc (McNeel & Mersmann, 1999) mais pas chez l'Homme (Krief *et al.*, 1993 ; Mak *et al.*, 1996), indiquant que ce troisième sous-type de récepteur  $\beta$ -adrénergique ne s'exprime pas dans les voies respiratoires humaines. Ces résultats sont corrélés par une étude démontrant qu'il n'existe aucune réponse fonctionnelle  $\beta_3$ -adrénergique dans les poumons humains (Newnham *et al.*, 1993). Cependant, ces études étant relativement anciennes et la sensibilité des techniques actuelles étant supérieure, leurs conclusions doivent être prises avec précaution.

## 6- Régulation $\beta_3$ -adrénergique de CFTR

L'hypothèse d'une relation fonctionnelle entre le  $\beta_3$ -AR et CFTR est née de l'observation par l'équipe de Chantal Gauthier dans le laboratoire, d'une différence de réponse à la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique entre les biopsies cardiaques saines et mucoviscidosiques. En effet, la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique du myocarde sain provoque un raccourcissement du potentiel d'action cardiaque ainsi qu'une légère diminution d'amplitude, alors qu'aucun effet n'est constaté sur les myocards mucoviscidosiques (Leblais *et al.*, 1999) (Fig.39).

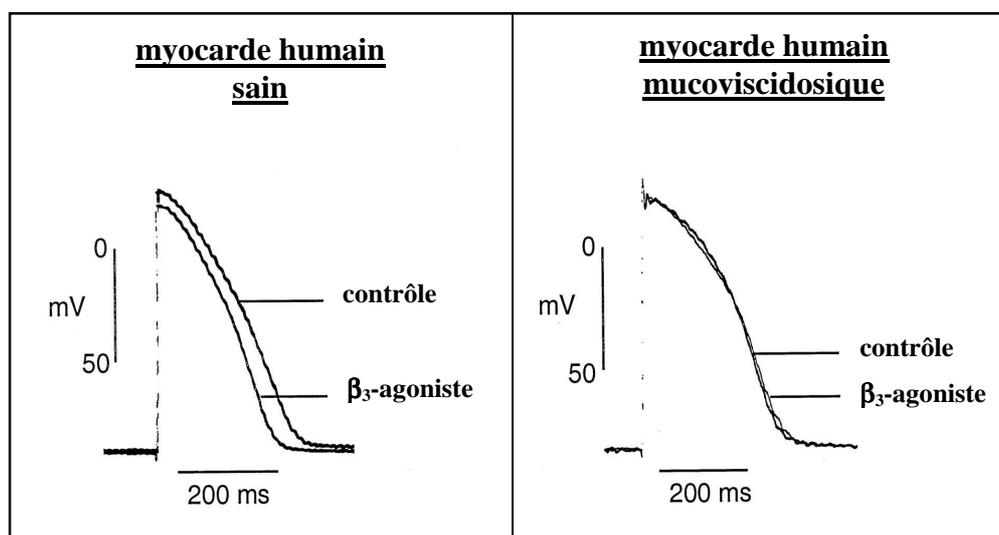


Figure 39. Effet de la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique sur le potentiel d'action de biopsies myocardiques humaines saine et mucoviscidosique (d'après Leblais *et al.*, 1999).

Ces résultats ont suggéré que l'absence de réponse observée sur les myocardes mucoviscidosiques soit la conséquence de l'absence fonctionnelle du canal chlorure CFTR. Sur les prélèvements sains, la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique activerait la conductance chlorure de CFTR, produisant ainsi un courant repolarisant participant au raccourcissement de la durée du potentiel d'action.

Par la suite, l'équipe a démontré dans différents modèles cellulaires que le  $\beta_3$ -AR est capable d'activer CFTR selon deux mécanismes distincts.

Premièrement, la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique active le courant chlorure de CFTR par une voie indépendante de l'AMPC – PKA (Leblais *et al.*, 1999). En effet, cette activation mobilise les sous-unités  $\beta/\gamma$  de  $G_{i/o}$  pour recruter la voie PI3K – ERK1/2 qui phosphorylerait CFTR (Robay *et al.*, 2005). Cette voie de régulation de CFTR n'avait jamais été identifiée auparavant.

Deuxièmement, dans des cellules alvéolaires humaines, l'expression simultanée de CFTR avec des quantités croissantes de  $\beta_3$ -AR provoque une activation croissante de CFTR en l'absence de toute stimulation (Leblais *et al.*, 1999). Aux concentrations les plus fortes en  $\beta_3$ -AR, CFTR est activée de façon maximale et constitutive si bien que les stimulations du  $\beta_3$ -AR ou de la PKA n'ont plus d'effet de potentialisation (Leblais *et al.*, 1999).

En conclusion, pour une faible expression du  $\beta_3$ -AR, les canaux CFTR sont à l'état fermé et sont sensibles à la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique. En revanche, pour une forte expression du  $\beta_3$ -AR, les canaux CFTR sont activés de façon constitutive et perdent leur sensibilité aux agonistes  $\beta_3$ -adrénergiques et aux activateurs de la PKA.

## VI- MUCOVISCIDOSE : APPROCHES THÉRAPEUTIQUES

L'arsenal thérapeutique actuel contre la mucoviscidose recense simplement des traitements symptomatiques de la pathologie. C'est pourquoi, malgré leur amélioration constante et l'augmentation de l'espérance de vie des patients, la découverte d'un traitement curatif permettant d'abandonner les lourds traitements symptomatiques est une nécessité pour les personnes atteintes par cette maladie génétique. Pour cela, différents axes de recherche sont explorés et peuvent être classés, selon la technologie adoptée, en thérapie génique, thérapie cellulaire et pharmacothérapie.

### 1- La thérapie génique

La mucoviscidose étant une maladie monogénique, la thérapie génique a rapidement semblé bien adaptée. Ainsi, les premiers résultats apparaissent peu de temps après la découverte du gène *CFTR*. Les premières expérimentations ont lieu *in vitro* et démontrent la faisabilité du transfert viral de gène *CFTR* dans une lignée cellulaire pancréatique mucoviscidosique, ainsi que la restauration du courant chlorure activé par l'AMPc (Drumm *et al.*, 1990). Les essais sur l'animal vont ensuite cibler principalement les voies respiratoires, siège des symptômes morbides chez l'Homme. Ainsi, des résultats sont obtenus *in vivo* dans l'appareil respiratoire de rat (Rosenfeld *et al.*, 1992), puis dans l'épithélium nasal humain (Zabner *et al.*, 1993). Ces études rapportent des résultats d'abord prometteurs, d'autant plus que les vecteurs viraux parviennent à transfecter les différents types cellulaires de l'arbre bronchique (Mastrangeli *et al.*, 1993). Cependant, l'apparition d'une inflammation pose des questions de sécurité et d'ordre éthique (Simon *et al.*, 1993). Par ailleurs, les résultats obtenus chez l'homme sont plutôt décevants du fait d'une expression du transgène limitée à quelques semaines, d'un faible pourcentage de cellules transfectées et d'une inflammation, bien que cette dernière semble modérée (Knowles *et al.*, 1995). De plus, le renouvellement permanent de l'épithélium respiratoire exige des administrations répétées des vecteurs viraux, qui à terme, peuvent s'avérer complètement inefficaces suite à la réponse immunitaire engendrée (Harvey *et al.*, 1999). Un essai clinique récent consistant en l'administration par aérosol de deux doses de vecteur viral contenant le gène *CFTR*, a démontré que ce traitement est bien toléré par les patients. Cependant, aucune amélioration significative de la fonction respiratoire n'a été observée (Moss *et al.*, 2007).

Des solutions alternatives aux virus ont du être envisagées afin de limiter la réponse immunitaire et autres inconvénients liés aux virus, tels que la taille limitée du transgène qui peut être inséré dans la capsid virale. Différents vecteurs non viraux de transfert de gène ont ainsi été élaborés. Ils sont pour la plupart de nature lipidique et donc hydrophobes, mais certains possèdent une partie hydrophile (électriquement chargée ou non). Ainsi, pendant l'effervescence des essais de thérapie génique par vecteurs viraux, les premiers tests de transfert de gène par lipide cationique ou liposome sont effectués dans les voies respiratoires. Ces composés s'avèrent être parfaitement tolérés *in vivo*, n'induisent pas ou peu de réaction inflammatoire et permettent d'incorporer d'importantes quantités d'ADN (Nabel *et al.*, 1992 ; San *et al.*, 1993 ; Yoshimura *et al.*, 1992). La durée d'expression du transgène est transitoire mais, contrairement aux vecteurs viraux, les administrations peuvent être répétées sans perte d'efficacité (Goddard *et al.*, 1997 ; Hyde *et al.*, 2000). De plus, l'administration par aérosol est facile d'emploi. Cependant, l'efficacité du transfert non viral de gène est relativement faible à cause du pourcentage peu important de cellules transfectées. Une des raisons est que le mucus épais et visqueux constitue un obstacle. Des agents mucolytiques ont été testés mais ils n'apportent qu'une faible augmentation de l'efficacité du transfert de gène (Ferrari *et al.*, 2001). D'autres améliorations du transfert viral et non viral de gène doivent être apportées pour avoir un impact clinique significatif dans le traitement de la mucoviscidose.

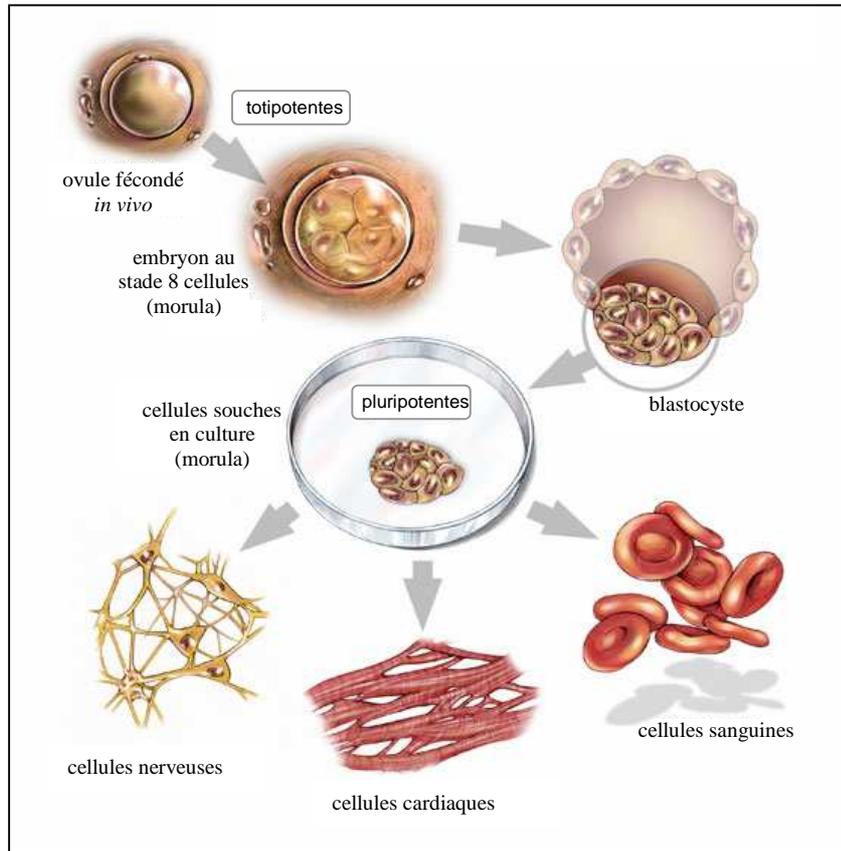
## **2- La thérapie cellulaire**

Par extension, la thérapie génique permet d'envisager un traitement de la mucoviscidose par thérapie cellulaire. Il faudrait pour cela administrer au patient des cellules souches homologues (issues du patient lui-même) corrigées par thérapie génique, ou des cellules saines hétérologues (issues d'un autre individu). Les cellules souches sont classées en trois groupes selon leur origine : cellules souches embryonnaires, cellules souches de moelle osseuse et cellules souches progénitrices issues d'un tissu ou d'un organe particulier.

### **1- Les cellules souches embryonnaires**

Les cellules souches embryonnaires proviennent d'un embryon au stade blastocyste (5 à 7 jours après la fécondation chez l'humain). Ces cellules sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en n'importe quel type cellulaire sauf ceux formant les membranes embryonnaires (Fig.40). Ainsi, il a été montré récemment que des cellules

souches embryonnaires murines sont capables de former un épithélium respiratoire complet avec les différents types cellulaires le constituant (Coraux *et al.*, 2007).



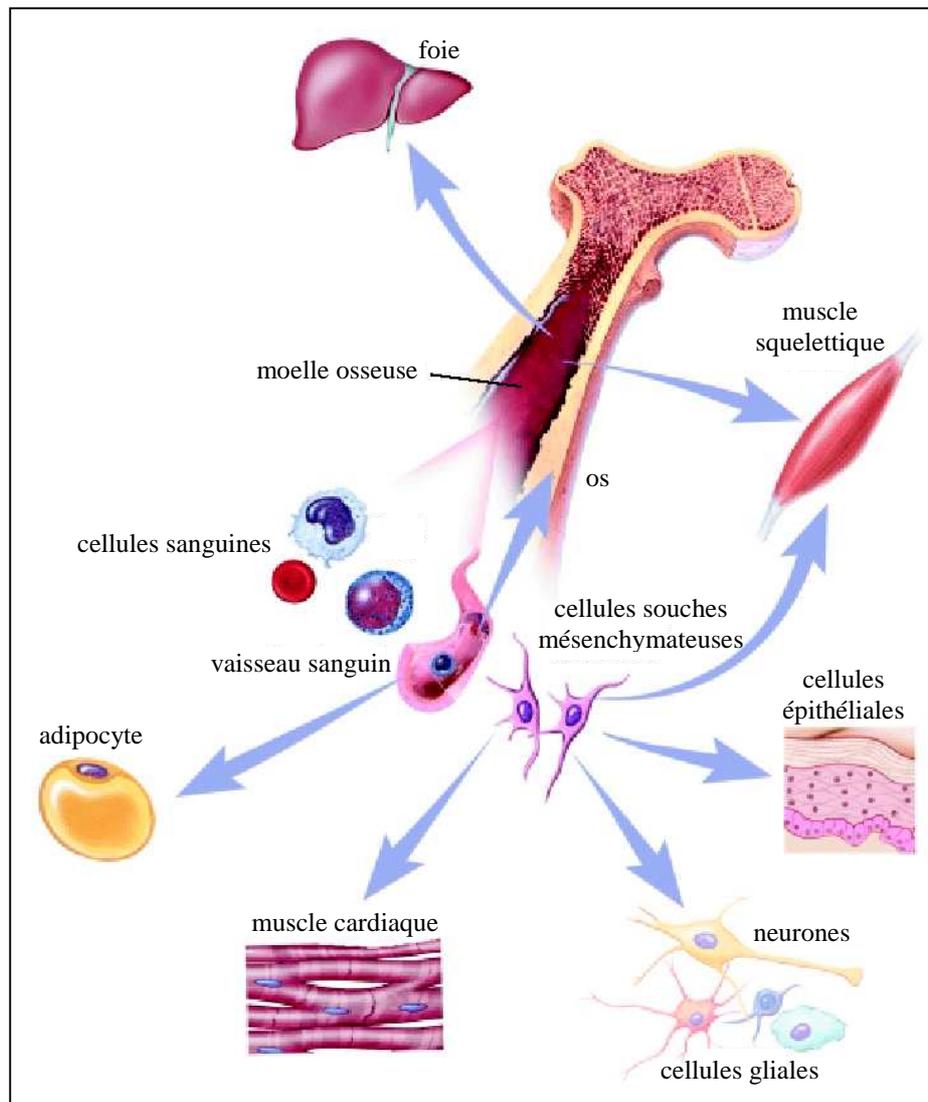
**Figure 40. Provenance et devenir potentiel des cellules souches embryonnaires (d'après <http://www.amyshah.com/2007/04/>).**

Mais la recherche sur les cellules souches embryonnaires doit résoudre quelques problèmes. En effet, des questions d'ordre éthique sont levées lorsqu'il s'agit de cultiver des embryons humains dans un but médical. De plus, la transplantation de cellules souches hétérologues requiert la suppression du système immunitaire du receveur. Par ailleurs, les techniques d'administration de ces cellules et leur attachement au tissu cible doivent être optimisés.

## 2- Les cellules souches de la moelle osseuse

La moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse où les lignées cellulaires sanguines sont perpétuellement régénérées. En plus de ce constant renouvellement des lignées sanguines, les cellules souches hématopoïétiques sont capables de se différencier vers diverses lignées non sanguines dont des cellules épithéliales des voies respiratoires (Krause *et al.*, 2001 ; Jiang *et al.*, 2002). La transplantation de souris ne possédant pas le gène *cftr* (souris *cftr*<sup>-/-</sup>) avec des cellules souches hématopoïétiques de souris saines a permis de détecter une réponse fonctionnelle, de même que l'ARNm et la protéine *cftr* dans les poumons et le tractus digestif de ces animaux (Bruscia *et al.*, 2006). Mais la réponse fonctionnelle est modeste et les taux d'ARNm et de protéines *cftr* sont bas. Ceci s'explique par le faible taux d'implantation des cellules souches parmi les cellules natives des tissus étudiés, qui est inférieur à 1 % (Bruscia *et al.*, 2006). Mais ces résultats sont contredits par certains auteurs montrant que les cellules souches hématopoïétiques ne parviennent pas à se différencier en cellules épithéliales respiratoires, bien qu'elles puissent contribuer à la réparation de l'épithélium pulmonaire (Kotton *et al.*, 2005 ; Macpherson *et al.*, 2005). Cependant, ces cellules souches expriment des marqueurs de cellules épithéliales lorsqu'une lésion est provoquée au poumon (Macpherson *et al.*, 2006). Des études sont encore nécessaires pour éclaircir les possibilités de différenciation des cellules souches hématopoïétiques et améliorer leur implantation dans les poumons.

Dans la moelle osseuse, il existe un autre type de cellules souches, les cellules souches mésenchymateuses ou stromales. Ces cellules renouvellent les cellules du stroma de la moelle osseuse et les différents types de cellules osseuses, mais aussi les cellules adipocytaires, endothéliales et musculaires (Fig.41). Mais elles seraient également capables de se différencier en d'autres types cellulaires, notamment en cellules respiratoires (Wang *et al.*, 2005).



**Figure 41. Voies possibles de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (d'après <http://www.brown.edu/Courses/BI0032/adltstem/asc.htm>).**

Ces cellules font l'objet d'une attention croissante compte tenu de leur relative facilité d'isolement, leur multiplication rapide en culture et leur utilisation possible en transplantation autologue. D'ailleurs, des cellules souches mésenchymateuses mucoviscidiques humaines corrigées par thérapie génique, sont capables de se différencier à l'intérieur d'un épithélium respiratoire mucoviscidique reconstitué et de produire un courant chlorure apical régulé par l'AMPC (Wang *et al.*, 2005). Mais les cellules souches mésenchymateuses semblent être une population hétérogène. Il est probable que seule une sous-population particulière est à l'origine des effets bénéfiques observés. Des travaux approfondis sont requis pour mieux caractériser ces cellules et augmenter leur capacité d'implantation.

### 3- Les cellules souches progénitrices pulmonaires

Les cellules progénitrices issues des poumons pourraient être une source pour la thérapie cellulaire de la mucoviscidose. Mais ces cellules progénitrices sont différentes selon le niveau de l'arbre respiratoire étudié. Au niveau des alvéoles, ce sont les cellules alvéolaires de type II (Adamson & Bowden, 1974), dans les bronchioles ce sont les cellules de Clara (Evans *et al.*, 1978) alors qu'au niveau trachéo-bronchique, il semble y avoir plusieurs populations progénitrices (Hong *et al.*, 2004). L'avantage de ces cellules progénitrices est que l'orientation de leur différenciation vers une lignée épithéliale respiratoire devrait être plus facile qu'avec des cellules d'une autre origine. En revanche, si elles doivent être utilisées pour traiter la mucoviscidose, il faudra pouvoir en obtenir un nombre suffisant à partir des poumons des patients. Par ailleurs, leur prolifération *in vitro* par des méthodes de culture cellulaire devra être mise au point.

### 3- La pharmacothérapie

Le traitement pharmacologique de la mucoviscidose vise à corriger le défaut des protéines mutantes CFTR. Cependant, selon le mutant considéré, les défauts à corriger peuvent être différents : défauts de repliement, d'adressage, de stabilité, de conductance. Par ailleurs, CFTR ayant plusieurs fonctions, certaines approches tentent de corriger une seule fonction.

La thermosensibilité du mutant  $\Delta F508$  a suggéré à la communauté scientifique qu'il est possible de manipuler les processus de repliement/maturation/adressage dans un but thérapeutique. Cependant, l'abaissement de la température corporelle n'est pas envisageable, et d'autres stratégies doivent être employées.

#### 1- Les chaperonnes chimiques

Les chaperonnes chimiques sont des molécules liposolubles permettant leur entrée dans la cellule. Elles sont étudiées pour leur capacité à faciliter le repliement et/ou la maturation protéique.

Le glycérol est un polyalcool naturel non-chargé et connu pour stabiliser les protéines (Gekko & Timasheff, 1981). Un traitement de cellules homozygotes pour  $\Delta F508$  avec 10 % de glycérol entraîne l'apparition de la forme mature glycosylée du mutant  $\Delta F508$  ainsi que d'une conductance chlorure apicale activée par l'AMPc (Sato *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que le glycérol stabilise une conformation intermédiaire de CFTR en la protégeant de la dégradation et lui permettant d'achever sa maturation hors du RE. Des résultats similaires sont obtenus après traitement des cellules avec un solvant polaire, le DMSO (diméthyl sulfoxyde) (Bebok *et al.*, 1998b). Mais la toxicité de ce produit et sa capacité à perméabiliser les cellules n'ont pas incité à poursuivre les investigations sur son effet bénéfique potentiel dans la mucoviscidose.

De la même façon, un autre osmolyte, la triméthylamine-N-oxyde (TMAO), ainsi que l'eau lourde (molécules d'eau formée de deutérium, isotope d'hydrogène) sont capables de corriger le défaut de maturation et d'adressage de  $\Delta F508$  (Brown *et al.*, 1996). D'ailleurs, ces composés, y compris le glycérol, sont capables de rectifier le défaut de repliement de mutants thermosensibles d'autres protéines, soulignant le caractère de stabilisateur protéique général de ces composés (Brown *et al.*, 1997). L'administration de ces composés a été testée *in vivo* chez la souris et a conduit à une mortalité importante des animaux (Bai *et al.*, 1998). Chez les souris survivantes, l'augmentation fonctionnelle de CFTR était relativement faible (Fischer *et al.*, 2001).

Par ailleurs, le constat que les reins sont peu affectés dans la mucoviscidose alors qu'ils expriment CFTR a amené une équipe à cultiver des cellules exprimant  $\Delta F508$  dans des conditions similaires à celles rencontrées dans l'organe, c'est-à-dire en hyperosmolarité (250 mM de NaCl et 250 mM d'urée). Dans ces conditions de stress osmotique, les concentrations intracellulaires en glycéro-phosphorylcholine, myo-inositol, sorbitol, et taurine sont augmentées et corrigent le défaut du mutant  $\Delta F508$  (Howard *et al.*, 2003). L'administration de ces osmolytes individuellement, ou de bétaïne, parvient également à restaurer la maturation de la protéine mutée  $\Delta F508$  (Howard *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2003). Ces composés ont une fonction osmoprotectrice en stabilisant les protéines dans les environnements hyperosmotiques, les préservant ainsi de la dégradation.

Certains composés qui ne sont pas des chaperonnes chimiques proprement dit car ils n'ont pas de propriété stabilisatrice intrinsèque, sont cependant capables d'induire une

maturation correcte du mutant  $\Delta F508$  en interférant avec les chaperonnes moléculaires, partenaires physiologiques de la maturation protéique.

Ainsi, le butyrate modifie l'expression de certains gènes en inhibant les histones déacétylases (Candido *et al.*, 1978). Il a été démontré que le 4-phenylbutyrate (4PBA, Buphényl<sup>®</sup>), forme orale du butyrate, restaure l'expression apicale et la fonction du mutant  $\Delta F508$  (Rubenstein *et al.*, 1997). Cet effet est dû à la diminution d'expression de Hsc70 (Rubenstein & Zeitlin, 2000), l'augmentation d'expression de Hsp70 (Choo-Kang & Zeitlin, 2001) et diverses protéines impliquées notamment dans la régulation de la transcription (Wright *et al.*, 2004). Cela souligne par ailleurs que Hsc70 (forme constitutive) et Hsp70 (forme inductible) ne remplissent pas la même fonction. Les modulations d'expression induites par le butyrate impliquent des sérine/thréonine phosphatases (Cuisset *et al.*, 1997) ainsi que les MAPK de type ERK (Sugita *et al.*, 2004). Des essais cliniques de phase I/II ont eu lieu pour tester les effets du 4PBA administré oralement à des patients homozygotes pour  $\Delta F508$ . Les résultats démontrent une bonne tolérance du produit avec une amélioration faible mais significative de la différence de potentiel au niveau de l'épithélium nasal de ces patients (Rubenstein & Zeitlin, 1998 ; Zeitlin *et al.*, 2002).

S'inspirant des premiers résultats prometteurs du 4PBA, une équipe a testé l'effet de plusieurs acides gras à chaînes courtes sur l'adressage du mutant  $\Delta F508$ . Deux molécules (le 2,2-diméthyl-butyrates et l'acide  $\alpha$ -méthylhydrocinnamique) restaurent une fonction apicale de ce mutant (Nguyen *et al.*, 2006). Ces composés font également l'objet d'études contre le cancer pour leurs propriétés anti-prolifératives (Krishna *et al.*, 2002).

Malgré une controverse, les inhibiteurs de la pompe calcique du RE tels que la curcumine et la thapsigargine, permettraient d'augmenter l'adressage de la protéine mutée  $\Delta F508$ . Cet effet passerait par une altération de l'activité de la calnexine suite à la déplétion calcique du RE, permettant ainsi à  $\Delta F508$  de passer outre le contrôle qualité de la cellule (Egan *et al.*, 2004 ; Norez *et al.*, 2006a). Une autre équipe propose que l'effet de la curcumine, comme d'autres inhibiteurs de SERCA, passerait par l'inhibition d'une autre chaperonne, la calréticuline, pour conduire aux effets observés (Harada *et al.*, 2007). Une stimulation directe de l'activité chlorure de CFTR par la curcumine a également été décrite (Berger *et al.*, 2005).

Par ailleurs, le miglustat, un inhibiteur de l' $\alpha$ 1,2-glucosidase, est également capable de conférer un adressage et une fonction restaurés au mutant  $\Delta$ F508. Le miglustat semble agir en inhibant l'interaction de la protéine immature avec la calnexine (Norez *et al.*, 2006b). Ce composé, déjà autorisé sur le marché pour traiter la maladie de Gaucher sous le nom de Zavesca<sup>®</sup>, vient de débiter une étude clinique de phase II sur des patients atteints de mucoviscidose.

## 2- Les aminoglycosides

Les aminoglycosides sont des antibiotiques permettant chez les eucaryotes de passer outre les codons stops prématurés. Or, les mutations de *CFTR* faisant apparaître un codon stop prématuré sont retrouvées chez 10 % des patients mucoviscidosiques. De tels antibiotiques comme le G418 et la gentamicine permettent la traduction de la protéine entière et ainsi de restaurer une fonction apicale normale de *CFTR in vitro* dans des cellules portant des mutations stop (Howard *et al.*, 1996 ; Bedwell *et al.*, 1997). Des essais ont ensuite eu lieu sur des patients, tout d'abord en application locale sur l'épithélium nasal. Les résultats ont montré une augmentation significative de la différence de potentiel nasal sur les patients homozygotes ou hétérozygotes pour une mutation stop (Wilschanski *et al.*, 2000 ; Wilschanski *et al.*, 2003). Les effets observés sur la différence de potentiel nasal après administration systémique sont relativement faibles mais significatifs, et dépendent en partie de la mutation non-sens considérée (Clancy *et al.*, 2001 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007). Mais l'efficacité de ces antibiotiques sur des patients porteurs des mêmes mutations stop est variable. Cette variabilité provient du système de dégradation des ARN non-sens dont l'efficacité varie selon les types cellulaires et les individus (Linde *et al.*, 2007).

## 3- Les activateurs de CFTR

Les activateurs de *CFTR* visent à corriger le défaut de conductance, de probabilité d'ouverture ou de régulation des protéines issues de mutations de classe III et IV. Leur utilisation peut être également envisagée en association avec les chaperonnes chimiques car certains mutants, comme  $\Delta$ F508, ont en plus du défaut de maturation, un défaut de conductance. Plusieurs familles de molécules existent avec différents modes d'action.

*Les xanthines*

Ces composés sont trouvés naturellement dans le thé, le café, le cacao. Ce sont des dérivés purines ayant des propriétés antagonistes des récepteurs à l'adénosine mais aussi inhibitrices des phosphodiésterases.

Le plus connu est l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) (Fig.42). Ses propriétés d'inhibiteur non spécifique des phosphodiésterases entraînent une augmentation des taux d'AMPc et GMPc intracellulaires, ce qui stimule l'activité chlorure de CFTR (Drumm *et al.*, 1991). Cependant, il a été décrit qu'une partie de l'effet de l'IBMX serait indépendante de l'augmentation cellulaire en nucléotides cycliques (He *et al.*, 1998) mais résulterait d'une liaison prolongée de CFTR avec l'ATP (Chappe *et al.*, 1998).

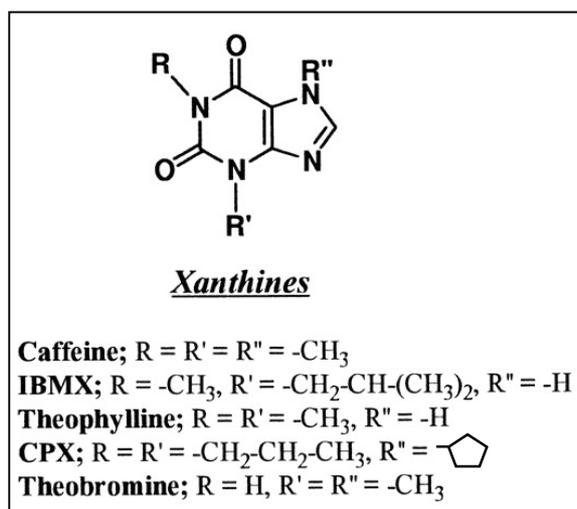


Figure 42. Structure des composés de la familles des xanthines (d'après Schultz *et al.*, 1999).

Un autre composé, le CPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) (Fig.42), a la propriété de restaurer partiellement la fonction du mutant  $\Delta F508$  mais est sans effet sur la protéine sauvage (Eidelman *et al.*, 1992 ; Guay-Broder *et al.*, 1995). L'effet du CPX ne passe pas par un antagonisme des récepteurs à l'adénosine (Jacobson *et al.*, 1997), comme suspecté initialement (Eidelman *et al.*, 1992), ni par une élévation du taux d'AMPc intracellulaire (Guay-Broder *et al.*, 1995 ; He *et al.*, 1998). Une étude a démontré que le mécanisme d'action des xanthines repose sur une interaction directe avec le domaine NBD1 de CFTR avec des affinités qui varie selon le composé considéré mais aussi avec la présence d'une mutation

(Cohen *et al.*, 1997). La mutation  $\Delta F508$  étant localisée dans le NBD1, l'affinité du CPX pour NBD1- $\Delta F508$  est plus forte que pour le NBD1 sauvage, expliquant les différences fonctionnelles observées. D'ailleurs, l'ordre d'affinité des xanthines pour NBD1 est similaire à celui de la stimulation de la sécrétion chlorure qu'elles induisent dans les cellules (Cohen *et al.*, 1997). Dans une étude menée chez des patients homozygotes pour  $\Delta F508$  ayant reçu une dose orale unique de CPX, le traitement est bien toléré. Cependant, aucune amélioration n'est observée dans les mesures de différence de potentiel nasal et de concentration chlorure de la sueur effectuées une, deux et quatre heures après l'administration (McCarty *et al.*, 2002).

Une équipe a proposé un autre mécanisme d'action pour les xanthines. Celles-ci maintiendraient le canal CFTR dans la configuration ouverte tout en bloquant partiellement le pore de la protéine, provoquant un courant résiduel permanent (Schultz *et al.*, 1994).

#### *Les flavones et isoflavones*

Les isoflavones sont des molécules trouvées naturellement dans les plantes (Fig.43). Elles possèdent diverses propriétés dont la première étudiée a été leur activité phyto-oestrogène chez les animaux. En effet, des moutons consommant de fortes quantités d'une plante de la famille du trèfle, source d'isoflavones, avaient des problèmes de fertilité (Bennets *et al.*, 1946).

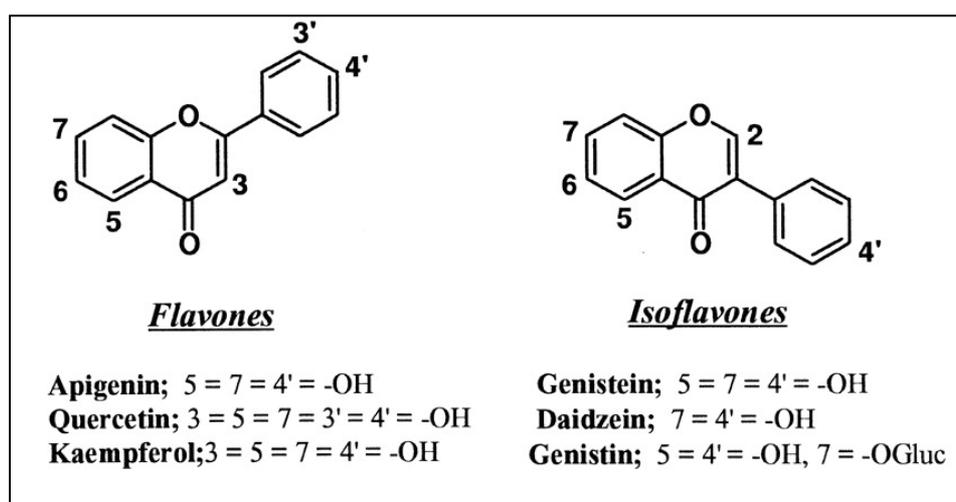


Figure 43. Structure des composés de la familles des flavones et isoflavones (d'après Schultz *et al.*, 1999).

Ces composés sont capables de stimuler les transports électrolytiques sur des cellules humaines (Nguyen *et al.*, 1991). Le plus étudié d'entre eux, la génistéine, est capable d'activer CFTR (Ilek *et al.*, 1995). Elle est également capable d'activer les CFTR mutés G551D ou  $\Delta$ F508 après traitement au 4PBA (Ilek *et al.*, 1999). La génistéine possède une activité inhibitrice des tyrosines kinases mais cette caractéristique est sans influence sur CFTR. Son action passe par une interaction avec le domaine NBD2 de CFTR (Wang F *et al.*, 1998). En effet, le domaine NBD2 est doué d'activités ATPase et GTPase mais il possède aussi une activité adénylate kinase capable de synthétiser de l'ATP à partir de deux molécules d'ADP. Toutes ces activités enzymatiques du domaine NBD2 sont inhibées par la génistéine. Le canal reste donc sous forme active, lié à l'ATP (Randak *et al.*, 1999). D'ailleurs, la mutation G1349D localisée dans le NBD2 supprime l'effet activateur de la génistéine (Melin *et al.*, 2004).

Par ailleurs, la génistéine est capable de restaurer les régulations réciproques entre ENaC et  $\Delta$ F508 ou entre ENaC et le mutant G551D (Suaud *et al.*, 2002a ; Suaud *et al.*, 2002b).

Les flavones et isoflavones possèdent d'autres propriétés qui pourraient être bénéfiques pour le traitement de la mucoviscidose. La génistéine aurait ainsi des propriétés anti-inflammatoires permettant de diminuer la sécrétion excessive d'interleukine-8 par les glandes bronchiques mucoviscidosiques (Tabary *et al.*, 1999). En outre, la quercétine (Fig.43) est capable de moduler l'expression de certaines chaperonnes de la famille Hsp. Elle diminue notamment l'expression de Hsp70 (Hosokawa *et al.*, 1992).

#### *Les benzimidazolones et benzoxazoles*

La famille des benzimidazolones est constituée de composés dérivés d'un colorant utilisé en peinture industrielle. Les benzimidazolones substitués, NS004 et NS1619 (Fig.44), activent les protéines CFTR sauvage et mutée  $\Delta$ F508 à condition que les cellules soient perméabilisées (Gribkoff *et al.*, 1994 ; Champigny *et al.*, 1995). Un autre composé de la même famille, 1-EBIO (1-ethyl-2-benzimidazolinone), active aussi CFTR mais il stimule également les canaux potassiques basolatéraux activés par le calcium ainsi que les canaux potassiques activés par l'AMPc (Devor *et al.*, 1996a ; Devor *et al.*, 1996b ; Cuthbert *et al.*, 1999). L'activation de CFTR serait à la fois directe et indirecte. La voie indirecte résulterait de

l'activation des canaux potassiques conduisant à une hyperpolarisation de la membrane apicale, et augmenterait le gradient électrique pour le passage d'ions chlorures à travers CFTR.

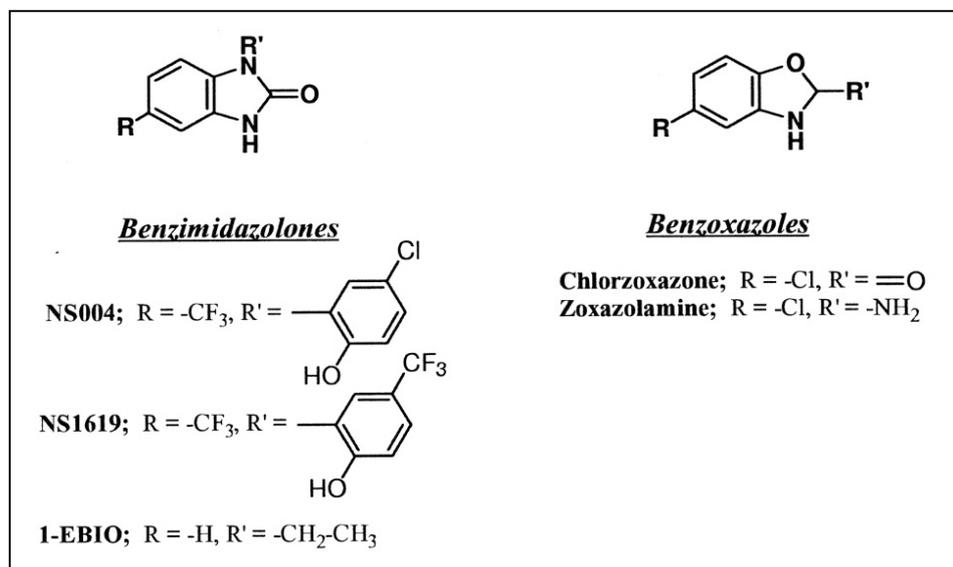


Figure 44. Structure des composés de la familles des benzimidazolones et des benzoxazoles (d'après Schultz *et al.*, 1999).

La chlorzoxazone, de la famille des benzoxazoles (Fig.44), est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) comme traitement pour soulager les contractures musculaires. La chlorzoxazone ainsi qu'un autre composé de la même famille, la zoxazolamine, stimulent indirectement CFTR par le biais de l'activation de canaux potassiques Ca<sup>2+</sup>-dépendants (Singh *et al.*, 2000). Par ailleurs, la chlorzoxazone et le composé 1-EBIO sont également capables de stimuler l'absorption sodique par activation indirecte de ENaC (Gao *et al.*, 2001).

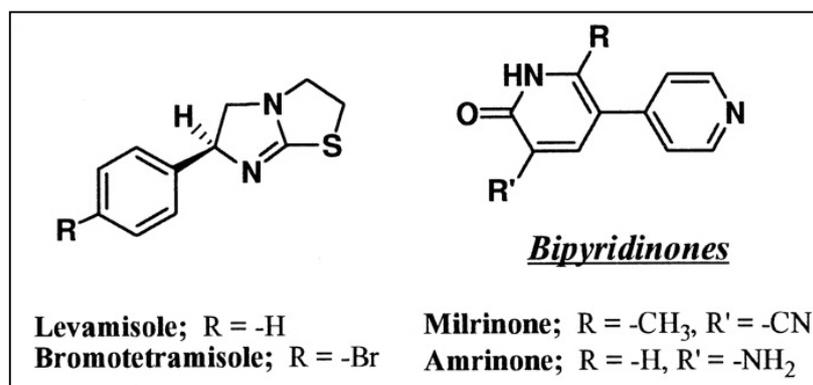
#### *Les composés benzo[c]quinolizinium*

Les composés Benzo[c]quinolizinium ont été obtenus par synthèse chimique. Ils sont des activateurs directs de CFTR qui n'affectent pas les taux intracellulaires d'AMPc ou d'ATP, ni l'activité des phosphatases (Becq *et al.*, 1999). Un composé de cette famille, le MPB-07, est même capable de corriger le défaut d'adressage du mutant  $\Delta F508$  dans des cellules épithéliales nasales humaines fraîchement isolées (Dormer *et al.*, 2001). Cette restauration de

la localisation du mutant provient d'une protection contre la dégradation du mutant par liaison au niveau du NBD1 (Stratford *et al.*, 2003). De plus, le MPB-07 réduit également la réponse inflammatoire après l'exposition des cellules à *P. aeruginosa* (Dechecci *et al.*, 2007). Cependant, cette molécule est photosensible et se dégrade rapidement (Olivier *et al.*, 2002).

#### *Les inhibiteurs de phosphatases et de phosphodiesterases*

L'activité de CFTR est régulée par une balance entre l'action positive des kinases et l'action négative des phosphatases. L'inhibition de l'activité des phosphatases pourrait donc avoir un effet bénéfique sur l'activité de CFTR et certains de ses mutants. Ainsi, des inhibiteurs des phosphatases PP1 et PP2A, comme la calyculine A, l'acide okadaïque ou la microcystine, permettent d'activer CFTR (Berger *et al.*, 1993 ; Hwang *et al.*, 1993). Des inhibiteurs de la phosphatase PP2B ont également montré leur capacité à activer CFTR (Fischer *et al.*, 1998). Les inhibiteurs des phosphatases alcalines, comme le levamisole et le bromotetramisole (Fig.45), sont également capables de stimuler la conductance chlorure de CFTR sauvage ainsi que différents mutants tels que R117H, G551D et  $\Delta$ F508 (Becq *et al.*, 1993 ; Becq *et al.*, 1994). Il faut cependant que le mutant  $\Delta$ F508 soit exprimé à la membrane plasmique par abaissement de la température ou traitement avec une chaperonne chimique.



**Figure 45.** Structure du lévamisole et son dérivé bromotétramisole ainsi que des composés de la familles des bipyridinones (d'après Schultz *et al.*, 1999).

Les inhibiteurs de phosphodiesterases, en augmentant les taux intracellulaires en nucléotides cycliques peuvent également activer CFTR. Les composés de la famille des bipyridinones, l'amrinone et la milrinone (Fig.45), sont des inhibiteurs de phosphodiesterases et activent CFTR en augmentant le taux d'AMPC intracellulaire (Kelley *et al.*, 1995). Ces

composés sont également capables de stimuler le mutant  $\Delta F508$  dans des lignées cellulaires humaines et des cellules épithéliales humaines isolées (Kelley *et al.*, 1996). Une étude *in vivo* réalisée chez la souris homozygote  $\Delta F508$  a montré que l'association de la milrinone avec un activateur de la PKA permet de restaurer une réponse fonctionnelle au niveau de l'épithélium nasal de ces animaux, alors que la milrinone seule ou l'activateur de la PKA seul sont sans effet (Kelley *et al.*, 1997b). De même chez les patients mucoviscidosiques, la milrinone seule n'a pas d'effet sur les mutations  $\Delta F508$  et G551D (Smith *et al.*, 1999).

#### *Autres molécules activatrices de CFTR*

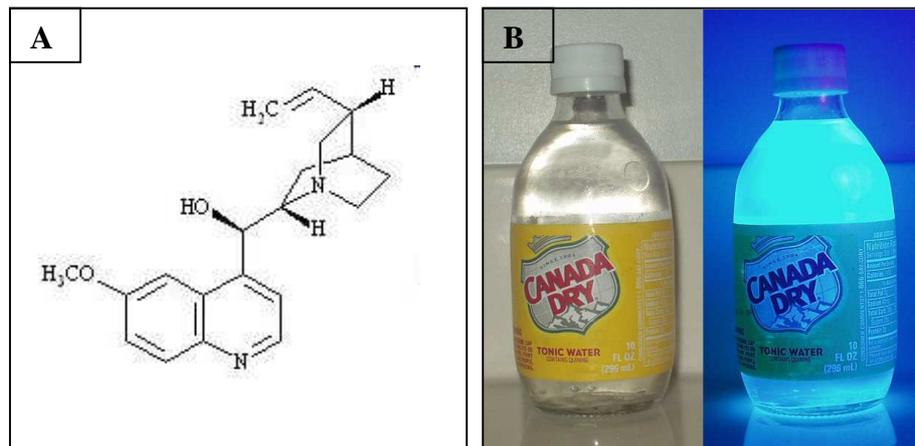
Divers autres composés naturels ou de synthèse sont susceptibles de stimuler la fonction de CFTR. Le peptide natriurétique de type C active ainsi CFTR et inhibe l'absorption sodique dans des lignées cellulaires humaines et chez la souris (Kelley *et al.*, 1997a ; Kelley *et al.*, 1998).

Par ailleurs, certains anesthésiques de la famille des alcanols peuvent activer CFTR sauvage et le mutant  $\Delta F508$  membranaire (Marcet *et al.*, 2004).

Ces dernières années, la technologie de criblage à haut-débit a permis de mettre en évidence de nouveaux activateurs des protéines CFTR sauvage et mutantes G551D ou  $\Delta F508$  cultivées à basse température. Puis, la synthèse de différents dérivés de ces molécules activatrices a conduit à améliorer leurs effets (Ma *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2003 ; Pedemonte *et al.*, 2005b). La même technique a été employée pour découvrir des molécules capables de corriger le défaut d'adressage de  $\Delta F508$  (Pedemonte *et al.*, 2005a). Ces résultats récents n'ont pas encore fait l'objet d'étude *in vivo*.

Peu importe le type de molécule envisagée pour les essais de traitement de la mucoviscidose, les résultats obtenus chez les patients sont généralement moins percutants que sur les lignées cellulaires ou sur les animaux. Par ailleurs, pour que les études pré-cliniques et cliniques soient concluantes, l'effet des placebos utilisés doit être contrôlé. Ainsi, la quinine est un composé aromatique fluorescent souvent utilisé dans ce type d'études car elle permet de masquer le goût des substances testées, notamment en bloquant des canaux potassiques (Cummings & Kinnamon, 1992) (Fig.46). La quinine a d'abord été utilisée pour traiter le paludisme. Elle est présente aussi en très faible quantité dans certaines boissons comme l'eau

tonique (Fig.46B). Cette molécule a également été décrite pour influencer le transport électrolytique au niveau des cellules épithéliales bronchiques humaines en culture primaire (Devor *et al.*, 2000). De plus, une étude récente démontre que la quinine altère la perméabilité épithéliale et inhibe l'activité de CFTR (Bates *et al.*, 2007). Par conséquent, son utilisation dans les protocoles d'étude clinique *in vivo* doit être repensée.



**Figure 46. (A) Structure moléculaire de la quinine et (B) illustration des propriétés fluorescentes de la quinine contenue dans certaines boissons.**

#### 4- Les activateurs de protéines "alternatives"

Alors que le transport chlorure *via* CFTR est absent ou très limité chez les patients mucoviscidosiques, le transport chlorure activé par le calcium est fonctionnel chez ces patients et peut être activé par l'ATP et l'UTP (Frizzell *et al.*, 1986 ; Boucher *et al.*, 1989 ; Mason *et al.*, 1991). En association avec l'amiloride pour inhiber l'absorption sodique par ENaC, l'UTP permet d'améliorer la clairance muco-ciliaire des patients mucoviscidosiques (Bennett *et al.*, 1996). Cependant, l'effet obtenu est actuellement de trop courte durée pour avoir une significativité clinique dans le temps.

Par ailleurs, la description d'un cas clinique a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la mucoviscidose pour des composés anti-tumoraux. Ainsi, un patient mucoviscidosique traité pour une tumeur maligne a vu ses symptômes respiratoires s'estomper et son infection à *P. aeruginosa* disparaître après la chimiothérapie (Lallemand *et al.*, 1997). La fonction respiratoire de ce patient est devenue quasiment normale et il n'a plus besoin de suivre son traitement par physiothérapie pour améliorer la clairance du mucus. Pourtant, le test de la sueur est toujours révélateur de la mucoviscidose. Des tests plus poussés ont révélé

la présence d'ARNm des gènes MDR et MRP dans les cellules épithéliales nasales de ce patient, alors que ces ARNm ne sont pas détectables chez un sujet sain. MDR (MultiDrug Resistance protein) et MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) sont des protéines appartenant à la famille des transporteurs ABC qui partagent 30 et 50 % d'homologie avec CFTR, respectivement. Ces protéines permettent de détoxifier les cellules et confèrent ainsi une résistance à certaines molécules habituellement néfastes. Or, certains transporteurs ABC sont capables de compenser la fonction défectueuse d'une autre protéine de la même famille (Tommasini *et al.*, 1996). D'ailleurs, la sur-expression de CFTR dans une lignée cellulaire murine confère à ces cellules un phénotype proche de cellules exprimant MDR ou MRP (Wei *et al.*, 1995). De plus, des substrats de MRP sont capables d'interagir avec CFTR pour moduler sa conductance chlorure en l'inhibant (Linsdell & Hanrahan, 1999). Il est ainsi possible que MDR et MRP puissent suppléer certaines fonctions de CFTR, expliquant l'amélioration des symptômes observée chez le patient mucoviscidose ayant subi une chimiothérapie. Par ailleurs, la doxorubicine utilisée dans les traitements anti-cancéreux permettrait, en inhibant l'interaction avec Hsp70, de corriger en partie le défaut de  $\Delta F508$ , faisant de cette molécule une possible chaperonne chimique (Maitra *et al.*, 2001 ; Maitra & Hamilton, 2007). Mais ces résultats sont en désaccord avec ceux réalisés dans une lignée cellulaire humaine dans laquelle la doxorubicine stimule l'expression de MDR mais inhibe celle de CFTR en diminuant son taux d'ARNm (Cao *et al.*, 2003).

En outre, l'azithromycine, un antibiotique utilisé pour lutter contre les infections bactériennes dans la mucoviscidose, semble aussi capable de compenser les dysfonctions de CFTR. En effet, un traitement journalier pendant quatre semaines à l'azithromycine de patients mucoviscidosiques permet d'augmenter significativement la conductance chlorure apicale de l'épithélium nasal. Une corrélation positive a été décrite entre le taux d'ARNm de MRP et la restauration de la différence de potentiel au niveau de l'épithélium nasal (Pradal *et al.*, 2005). Cependant, deux autres études n'ont pas révélé de modification des taux d'ARNm MDR ou de différence de potentiel nasal après traitement à l'azithromycine, même si une amélioration des symptômes respiratoires a été observée (Barker *et al.*, 2005 ; Equi *et al.*, 2006).

## VII- OBJECTIFS

La découverte en 1989 du gène impliqué dans la mucoviscidose a permis de grands progrès sur la compréhension de la maladie, la mise en place des symptômes et leur évolution. Cela a permis d'envisager de nombreuses approches thérapeutiques ciblant différents processus physiopathologiques, différents organes et différentes mutations. L'étude des protéines régulatrices de CFTR a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régissant sa maturation, son adressage et sa stabilité à la membrane des cellules. Aujourd'hui, ces protéines régulatrices constituent de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour améliorer l'adressage membranaire et/ou la fonction de certaines protéines CFTR mutantes.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse se sont, dans un premier temps, attachés à étudier l'influence d'un partenaire protéique de CFTR, NHE-RF1, sur l'adressage et la fonction de  $\Delta F508$ , la protéine mutée la plus fréquente chez les patients atteints par la mucoviscidose.

En effet, NHE-RF1 interagit directement avec CFTR (Hall *et al.*, 1998 ; Short *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1998) et occupe une fonction importante dans l'adressage de CFTR (Moyer *et al.*, 1999 ; Moyer *et al.*, 2000). La liaison entre CFTR et NHE-RF1 est également cruciale pour le recyclage endocytaire de CFTR et sa stabilité à la membrane, la suppression de cette interaction conduisant CFTR à une dégradation accélérée (Haardt *et al.*, 1999 ; Benharouga *et al.*, 2001 ; Swiatecka-Urban *et al.*, 2002).

En revanche, aucune étude jusque là n'avait étudié les relations qui pouvaient exister entre NHE-RF1 et le mutant  $\Delta F508$ .

Dans un second temps, la suite de mes travaux de thèse a été suscitée par la relation fonctionnelle unissant le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique et CFTR.

En effet, notre équipe a démontré que le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique est capable d'activer CFTR par une nouvelle voie de signalisation, indépendante de l'AMPc/PKA (Leblais *et al.*, 1999), mais impliquant les MAPK de type ERK1/2 (Robay *et al.*, 2005). Par ailleurs, ce récepteur n'est pas sensible au phénomène de désensibilisation qui caractérise les deux autres sous-types  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . Par conséquent, dans le contexte de la mucoviscidose, avec des mutations provoquant un défaut de conductance de CFTR ou après correction du défaut d'adressage d'une mutation sévère, ce serait un bon candidat pour augmenter l'activité de CFTR par traitement pharmacologique avec un agoniste spécifique. Ce genre de traitement est

facilement envisageable par aérosol au niveau de l'appareil respiratoire, siège des symptômes les plus graves. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'a détecté la présence du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique dans les voies respiratoires humaines (Krief *et al.*, 1993 ; Mak *et al.*, 1996).

Afin de clarifier les données de la littérature, le deuxième objectif de ma thèse a donc été de caractériser par des approches complémentaires le récepteur  $\beta_3$ -adrénergique dans les poumons humains. Compte tenu de ces caractéristiques (activation par des taux élevés de catécholamines, résistance au phénomène de désensibilisation), j'ai ensuite comparé son niveau d'expression chez les patients mucoviscidosiques qui présentent un tonus adrénergique élevé. En parallèle, les niveaux d'expression du  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ -AR mais aussi de NHE-RF1 ont été évalués et comparés entre les patients contrôles et mucoviscidosiques.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

# I- MATÉRIEL BIOLOGIQUE

## 1- Lignées cellulaires

La lignée A549 provient de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elle a été établie à partir d'un carcinome pulmonaire humain (Giard *et al.*, 1973). Ces cellules s'organisent en monocouche de cellules qui peuvent se polariser en culture sur filtre (Foster *et al.*, 1998 ; Bose *et al.*, 2001). Elles présentent les caractéristiques morphologiques et métaboliques de cellules épithéliales alvéolaires de type II (Lieber *et al.*, 1976 ; Foster *et al.*, 1998). Ces cellules n'expriment pas la protéine CFTR de façon endogène (Finkbeiner *et al.*, 1993).

La lignée MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) de type II provient de l'ATCC. Cette lignée est issue de cellules rénales de chiens. Ces cellules forment un épithélium polarisé en culture et n'expriment pas CFTR de façon endogène, contrairement aux cellules MDCK de type I (Mohamed *et al.*, 1997).

Les lignées 16HBE14o- et CFBE41o- ont été obtenues auprès du Dr Dieter Gruenert (California Pacific Medical Center, San Francisco, CA, USA). Ces deux lignées sont issues d'un isolement de cellules épithéliales bronchiques humaines chez un individu sain pour 16HBE14o-, et chez un patient homozygote pour  $\Delta F508$  pour CFBE41o-. Ces cellules forment un épithélium polarisé et expriment CFTR sauvage ou  $\Delta F508$  de façon endogène (Cozens *et al.*, 1994 ; Ehrhardt *et al.*, 2006).

Chacune de ces quatre lignées est cultivée dans des flasques en plastique de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc, Polylabo). Pour les lignées 16HBE14o- et CFBE41o-, le fond des flasques est revêtu d'une solution à base de collagène et de fibronectine afin de créer un support biologique ayant des caractéristiques proches d'une lame basale. Cette solution de revêtement est constituée de milieu "LHC basal medium" complété en albumine sérique bovine (100 µg/ml), en collagène I bovin (31 µg/ml) et en fibronectine humaine (10 µg/ml). Toutes les lignées sont maintenues à 37°C dans un incubateur humidifié, en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Tous les éléments nutritifs des cellules sont contenus dans les milieux de culture supplémentés en sérum et antibiotique. La composition des milieux varie selon le type cellulaire (tableau 1).

	A549	MDCK	16HBE14o-	CFBE41o-
Milieu de culture	Ham F12-K	DMEM	MEM + Earle's salt	
Sérum de veau foetal (%)	10	10	10	
Pénicilline (UI/ml)	100	100	100	
Streptomycine ( $\mu\text{g/ml}$ )	100	100	100	
L-glutamine (mM)	-	-	2	

**Tableau 1. Compositions des milieux de culture.**

Ham F12-K : milieu de Ham F12 modifié par Kaighn ; DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium ; MEM : Minimum Essential Medium ; SVF : sérum de veau foetal.

Les cellulesensemencées dans les flasques se divisent jusqu'à former un tapis cellulaire. Quand la confluence des cellules atteint 80-90%, elles sont repiquées selon le protocole suivant. Les 5 ml de milieu de culture de la flasque sont retirés et remplacés par 2 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) (tableau 2) contenant 0,1% d'EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid).

PBS	
NaCl (mM)	137
KCl (mM)	2,7
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mM)	8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)	1,5
pH (ajusté avec NaOH)	7,4

**Tableau 2. Composition du PBS.**

Le PBS permet de rincer le tapis cellulaire et d'éliminer les traces de sérum. En effet, le sérum peut inhiber l'action de la trypsine qui est utilisée après avoir retiré le PBS. La trypsine est une enzyme digestive qui dégrade les protéines permettant aux cellules d'adhérer à leur support. Ainsi le fond de la flasque est recouvert de 1 ml de trypsine dilué à 0,25% dans du PBS + 0,1% EDTA. L'EDTA est un agent chélateur. En fixant les ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, il permet la pleine activité de la trypsine. La flasque est alors placée à 37°C pour une activité optimale de la trypsine. Le temps d'action de l'enzyme, entre 5 et 10 minutes, dépend du type cellulaire.

L'action de la trypsine est alors interrompue par addition de 4 ml de milieu de culture. Les cellules agglomérées sont séparées par des allers-retours successifs du milieu de culture dans la pipette. La concentration cellulaire de la suspension est estimée sur lame de Malassez par dilution au  $\frac{1}{2}$  avec un colorant vital, le bleu Trypan 0,05%. Les cellules sont ensuite diluées à la concentration souhaitée dans 5 ml de milieu. Elles sont alorsensemencées dans une nouvelle flasque et placées dans l'incubateur à 37°C. Pour les cellules 16HBE14o- et CFBE41o-, le milieu de culture est changé tous les deux à trois jours.

## **2- Les tissus bronchiques humains**

Les tissus bronchiques humains sont obtenus à partir soit de biopsies bronchiques réalisées chez des patients ayant subi une résection pulmonaire, soit de poumons explantés lors d'une transplantation de patients mucoviscidosiques.

Les prélèvements sont transportés dans un milieu de recueillement maintenu à 4°C. Ce milieu est constitué de milieu RPMI 1640 supplémenté avec de l'insuline (1  $\mu\text{g/ml}$ ), de l'apoferrine (1  $\mu\text{g/ml}$ ), de l'EGF (10  $\text{ng/ml}$ ), de l'hydrocortisone (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), de l'acide rétinolique (vitamine A) (10  $\text{ng/ml}$ ), de la gentamicine (50  $\mu\text{g/ml}$ ), de l'amphotéricine B (fungizone) (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) et de la pénicilline/streptomycine (200 U/ml). Ces tissus sont ensuite congelés dans l'azote liquide et placés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour une utilisation ultérieure.

## II- TECHNIQUES DE TRANSFECTION CELLULAIRE

### 1- Les vecteurs d'expression

Quelles qu'elles soient, les techniques de transfection permettent le transfert d'une séquence nucléotidique codante dans une cellule hôte. Toutes les séquences nucléotidiques utilisées dans nos travaux sont des ADN complémentaires (ADNc) insérés dans un vecteur d'expression ou plasmide pcDNA<sub>3</sub> si bien qu'ils sont sous contrôle d'un promoteur eucaryote fort d'origine virale, le promoteur CMV (CytomégaloVirus). Le plasmide pcDNA<sub>3</sub> contient également des séquences procaryotes qui permettent sa réplication en système bactérien.

Deux techniques de transfection transitoire ont été utilisées pour nos travaux : la micro-injection intranucléaire et la transfection par vecteur synthétique.

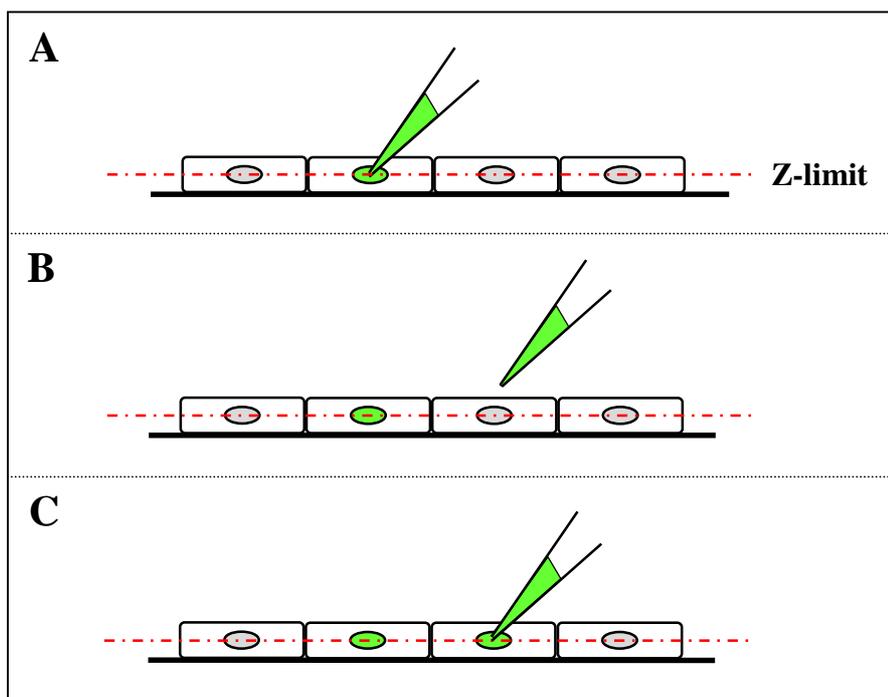
### 2- La micro-injection intranucléaire

La technique de micro-injection intranucléaire consiste à injecter les plasmides d'intérêt directement dans le noyau des cellules à l'aide d'une micropipette de verre. Chaque micropipette est fabriquée par étirement d'un capillaire de verre grâce à une étireuse horizontale (modèle P87, Sutter Instrument Corporation). Le diamètre interne de la pointe est de  $0,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . La micropipette est remplie de  $2 \mu\text{l}$  de la solution contenant les plasmides.

La solution d'injection dans laquelle sont dilués les plasmides contient 0,5% de FITC (fluorescéine isothiocyanate) couplé au dextran. Le FITC a la propriété de fluorescer à une longueur d'onde de 530 nm après excitation vers 488 nm. Le dextran, de poids moléculaire 150 kDa, augmente l'encombrement stérique du FITC et empêche ainsi sa diffusion au travers des membranes plasmique et nucléaire des cellules. La solution est iso-osmotique et contient 40 mM de NaCl, 50 mM de NaOH, 50 mM d'HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid) ; son pH est ajusté à 7,4 avec HCl. Avant sa première utilisation, la solution plasmidique est filtrée par centrifugation à 9 000 g pendant 15 minutes au travers d'un tube filtrant (filtre en PVDF, crible  $0,46 \mu\text{m}$ , Eppendorf).

La pipette est ensuite fixée à un porte-canule relié à un système pneumatique (Transjector 5246, Eppendorf) capable de soumettre au milieu intrapipette une pression dont

la valeur peut être réglée. Dans nos conditions expérimentales, la pression d'injection est de 60 hPa et le temps d'injection est de 0,3 secondes. Entre deux injections, une pression de compensation de quelques hPa empêche la remontée du milieu dans la micropipette par capillarité. L'injection est suivie sous microscope à épifluorescence (DIAPHOT-TMD, Nikon). Un micromanipulateur électronique (Micromanipulator 5171, Eppendorff) rend l'injection semi-automatique et permet de mémoriser un niveau vertical appelé "Z-limit" (Fig.47A) auquel la pipette descendra à chaque injection. L'expérimentateur doit donc placer la pointe de la pipette au-dessus des noyaux (Fig.47B) et déclencher l'injection (Fig.47C). Le micromanipulateur étant couplé au système pneumatique Transjector, l'injection de la solution plasmidique est synchronisée avec l'entrée de la micropipette dans le noyau de la cellule.



**Figure 47. Représentation schématique de la technique de micro-injection intranucléaire.**

**A :** mise en mémoire de la "Z-limit".

**B :** placement de la pointe de la micropipette au-dessus du noyau à injecter.

**C :** injection.

La technique de micro-injection intranucléaire présente plusieurs avantages :

1. La quantité de plasmide injectée dans chaque noyau est contrôlée. En utilisant un radioélément ( $^{99}\text{technétium}$ ) comme marqueur, le volume injecté peut être estimé. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, ce volume est de l'ordre du picolitre. Cela correspond à environ 10 000 copies de plasmide pour une concentration intrapipette de 100  $\mu\text{g/ml}$ .
2. Le rendement de transfection peut également être aisément estimé grâce à un gène rapporteur comme celui de la  $\beta$ -galactosidase. Il est alors possible de comparer le nombre de cellules colorées en bleu 24 ou 48 heures après injection au nombre de cellules micro-injectées. Ainsi, selon le type cellulaire, le rendement est compris entre 60 et 80%.
3. Cette technique est reproductible et applicable à différents types cellulaires.

En revanche, cette technique n'est pas appropriée pour l'étude d'une population importante de cellules. Dans ce cas, les cellules sont plutôt transfectées avec un vecteur synthétique.

### **3- Transfection par vecteur synthétique**

La transfection par vecteurs synthétiques consiste à introduire dans les cellules la séquence codante grâce à une molécule capable de condenser l'ADN et de lui faciliter l'entrée dans les cellules. Pour ces expériences, nous avons utilisé un polymère synthétique de transfert de gène, le JetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, France).

Le protocole employé est celui préconisé par le fournisseur et est décrit ci-après. Pour de type de transfection, les cellules ont étéensemencées lors du repiquage dans des plaques 6 puits. La transfection a lieu lorsque les cellules ont atteint environ 80% de confluence. Pour chaque puits de cellules, il faut préparer d'une part 3  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique dilué dans 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 150 mM, et d'autre part 6  $\mu\text{l}$  de JetPEI dilué également dans 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 150 mM. Le polymère est ensuite mélangé à l'ADN et la solution est mise à reposer pendant 15 minutes à température ambiante. Les 200  $\mu\text{l}$  de solution sont alors déposés et homogénéisés avec les 2 ml de milieu de culture du puits. Les cellules sont remises à 37°C pendant 24 ou 48h.

### III- BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

#### 1- Préparation des ARN totaux

Des préparations d'ARN totaux ont été réalisées pour rechercher l'expression de différents transcrits dans les lignées cellulaires et dans les tissus bronchiques humains. Pour cela, un protocole d'extraction utilisant le trizol (Gibco BRL, France), technique dérivée de la méthode au guanidinium thiocyanate-phénol-chloroforme (Chomczynski & Sacchi, 1987), a été utilisé. Les cellules ou tissus sont mis à incuber dans le trizol pendant 15 minutes à température ambiante. Les tissus sont préalablement broyés au polytron dans le trizol. Après les 15 minutes d'incubation, 0,2 ml de chloroforme est ajouté par ml de trizol. L'homogénat obtenu est incubé 3 minutes à température ambiante puis centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 12 000 g. La phase aqueuse supérieure contenant les ARNs totaux est récupérée et mise à précipiter avec 500 µl d'isopropanol par ml de trizol. Afin d'optimiser cette précipitation, les préparations sont incubées 15 minutes à température ambiante puis centrifugées à 4°C pendant 10 minutes à 12 000 g afin de former un culot d'ARN. Ce dernier est lavé avec 1 ml d'éthanol 75° par ml de trizol avant de subir une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 4°C et 7500 g. Les culots sont alors partiellement séchés et repris dans un volume adéquat d'eau. Afin d'obtenir une dissolution optimale, les préparations sont placées à 65°C pendant 10 minutes puis immédiatement stockés dans la glace. La qualité et les concentrations de nos extraits sont estimées par spectrophotométrie *via* le rapport des densités optiques 260/280 nm sur un appareil NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). Ce rapport doit être supérieur à 1,6 et proche de 2 afin d'exclure toute contamination par des sels ou des protéines. Une unité de DO à 260 nm correspond à 40 pg/ml d'ARN. Parallèlement, une migration des ARN par électrophorèse sur gel d'agarose permet d'évaluer leur qualité. Les ARN ribosomiaux, majoritaires dans ce type de préparation, sont visualisés sous la forme de deux bandes correspondant aux ARN ribosomiaux de 28 et 18S. La qualité de ces ARN ribosomiaux reflète la qualité des ARN de notre préparation.

## **2- Réverse transcription et amplification par polymérisation en chaîne (RT-PCR)**

Les ARN messagers ainsi obtenus sont réverse-transcrits en ADN complémentaires afin de subir l'amplification par PCR (Polymerase chain reaction).

### **1- La réverse-transcription**

Les ARN sont réverse-transcrits en ADN complémentaires à partir d'hexanucléotides aléatoires. La zone d'hybridation entre l'ARN et l'hexanucléotide sert de site d'initiation pour une ADN polymérase ARN dépendante d'origine virale, la M-MLV reverse-transcriptase (Murine Moloney Leukemia Virus reverse transcriptase) (Gibco BRL, France). Après une dénaturation de 10 minutes à 70°C, les ARN sont incubés 90 minutes à 42°C dans le milieu réactionnel suivant :

- 1 µl d'hexanucléotides aléatoires à 3 µg/µl (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ;
- 4 µl de tampon commercial « first-strand buffer » 5X (Invitrogen, Cergy Pontoise, France);
- 1 µl de dNTPs à 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France);
- 1 µl de DTT 0,1 M (Invitrogen, Cergy Pontoise, France);
- 1 µl de M-MLV à 200 U/µl (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

La réaction de réverse-transcription est arrêtée par chauffage à 93°C pendant 3 minutes. Des incubations contrôles dites non réverse-transcrites (NRT) sont réalisées sur la base du même milieu réactionnel, sans l'enzyme qui est remplacée par un volume équivalent d'eau. Ces réactions ont pour but de mettre en évidence une éventuelle contamination par l'ADN génomique, source d'artéfact pour l'interprétation de la PCR.

### **2- Amplification par réaction en chaîne de polymérisation**

Les ADN complémentaires ainsi synthétisés sont amplifiés par PCR qui consiste en une amplification d'un fragment défini d'ADN par hybridation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques. Un cycle de PCR comporte différentes étapes à des températures définies :

- une phase de dénaturation de l'ADN matriciel à 94°C pendant 45 secondes ;

- une phase d'hybridation des amorces spécifiques des extrémités de la portion d'ADN à amplifier avec une durée et une température propre à chaque couple d'oligonucléotides ;
- une phase de synthèse du brin d'ADN à 72°C pendant 1 minute.

Une PCR est composée d'un nombre adapté de cycles d'amplification, de 30 à 40, en fonction du niveau d'expression du transcrit recherché. Le mélange réactionnel est le suivant :

- 2,5 µl d'ADNc ;
- 2,5 µl de tampon commercial 10X (500 nM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH = 9) ;
- 0,5 µl d'oligonucléotides sens (20 pmol/l) ;
- 0,5 µl d'oligonucléotides anti-sens (20 pmol/l) ;
- 0,150 µl de Taq DNA polymérase (Amersham, France) ;
- de l'eau afin d'avoir un volume final de 25 µl.

gène considéré	nom de l'amorce	sens	séquence	température d'hybridation	taille d'amplification
<i>GAPDH</i>	GAPDH S2	sens	5'-actggcgtcttcaccaccatggagaaggct-3'	65°C	700 pb
	GAPDH AS1	anti-sens	5'-ctcctggaggccatgtaggccatgaggtc-3'		
$\beta_1$ -AR	$\beta_1$ ARS	sens	5'-gctgcagacgctcacca- 3'	60°C	212 pb
	$\beta_1$ ARAS	anti-sens	5'-gcgaggtagcggctccag-3'		
$\beta_2$ -AR	$\beta_2$ ARS	sens	5'-cacagccattgccaagtgcg-3'	60°C	287 pb
	$\beta_2$ ARAS	anti-sens	5'-cgggccttattctgtgcagc-3'		
$\beta_3$ -AR	$\beta_3$ AR1S	sens	5'-agctctcttgcccatg-3'	55°C	505 pb
	$\beta_3$ AR2S	sens	5'-acctggctgtgaccaac-3'		122 pb
	BL3AS	anti-sens	5'-actggctcatgatggggcg-3'		
<i>NHE-RF1</i>	NHERF-1107S	sens	5'-gagaccaagctgctgtg-3'	55°C	317 pb
	NHERF-1405AS	anti-sens	5'-ggccaggagatgtgaag-3'		
<i>CFTR</i>	CFTR-1186S	sens	5'-aatgtaacagccttctgggag-3'	55°C	371 pb
	CFTR-1557AS	anti-sens	5'-gttggcatgcttgatgac-3'		

Tableau 3. Caractéristiques des amorces oligonucléotidiques utilisées pour les expériences de PCR.

Une fois la PCR réalisée, 5 à 10 µl des différentes incubations avec ou sans reverse-transcription sont mis à migrer sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthydiuim (0,5 mg/ml). Pour chaque réaction d'amplification, les contrôles suivants sont effectués :

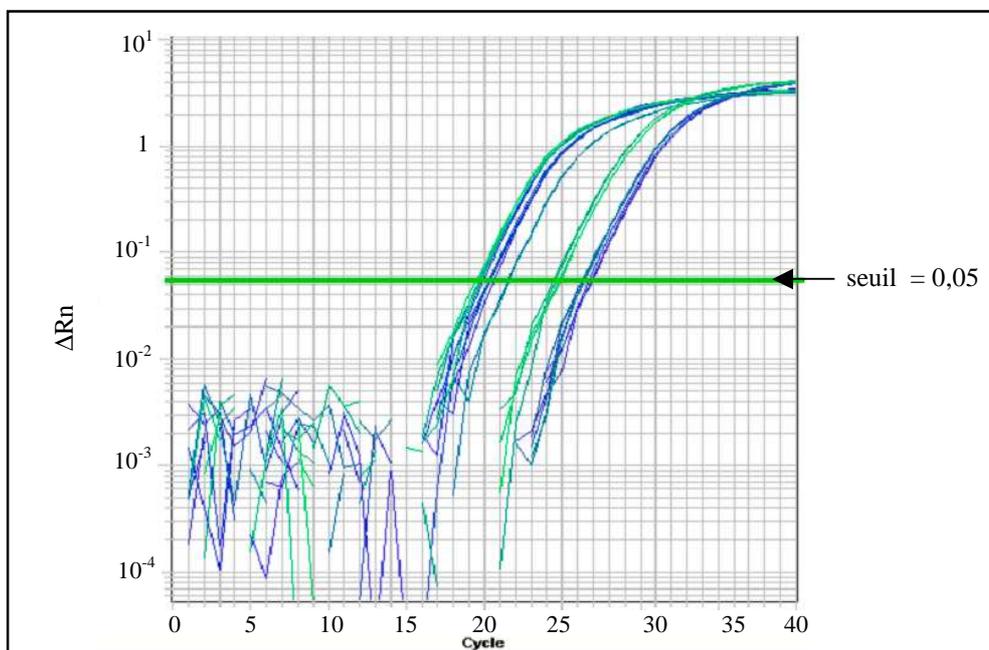
- un contrôle négatif où l'ADNc est remplacé par de l'eau afin de mettre en évidence une éventuelle contamination du mélange réactionnel ;
- un contrôle positif sur la base d'un plasmide contenant le gène d'intérêt afin de valider le protocole d'amplification ;
- un point non reverse-transcrit afin de mettre en évidence une éventuelle contamination par de l'ADN génomique.

### 3- RT-PCR quantitative en temps réel

La RT-PCR quantitative en temps réel permet la quantification précise des taux d'ARNm. Dans le cadre de cette technique, la reverse-transcription est réalisée avec un kit commercial spécifique (Applied Biosystems). La PCR quantitative est réalisée classiquement en quantifiant les produits amplifiés en fin de réaction. Or, à ce stade, les produits réactionnels sont limitants et la quantité de produit amplifié a atteint un plateau, si bien que les quantités détectées ne sont plus proportionnelles aux quantités initiales. La PCR quantitative en temps réel permet de suivre l'accumulation des produits au cours de la phase exponentielle d'amplification.

Deux méthodes distinctes peuvent être utilisées. La première méthode utilise des amorces couplées à un fluorochrome (6-carboxy-fluorescéine) et spécifiques de la séquence cible. La seconde technique utilise des amorces nucléotidiques classiques mais la solution de réaction contient un agent fluorescent (SyBR Green) qui s'intercale dans les molécules d'acides nucléiques à double brin. Un inconvénient de cette seconde méthode est que le SyBR Green peut s'intercaler dans n'importe quel amplicon. Ce problème n'est pas rencontré si les amorces utilisées sont spécifiques. De plus, on peut vérifier l'amplification non spécifique éventuelle à la fin des cycles de PCR en analysant la courbe de dissociation, c'est-à-dire en mesurant la fluorescence en fonction de l'élévation progressive de la température. En effet, un pic de fluorescence apparaît lorsqu'un amplicon se déshybride. S'il y a un seul type d'amplicon, il n'apparaît qu'un seul pic. Pour le gène du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique, la technique de Sybr Green a été choisie car aucune amorce directement couplée à un fluorochrome n'était suffisamment spécifique du gène humain. Pour les autres gènes, les amorces ont été fournies par Applied Biosystems.

Quelle que soit la méthode de PCR quantitative employée, à chaque cycle de PCR, la quantité d'amplicons est en théorie multiplié par deux et le niveau de fluorescence augmente en conséquence (Fig.48).



**Figure 48 : Représentation graphique de l'évolution de la fluorescence lors d'une PCR quantitative en temps réel.**

$\Delta Rn$  (reporter normalized) : variation de la fluorescence par rapport à la fluorescence basale.

Les premiers cycles de PCR sont caractérisés par une faible variation de l'émission de fluorescence. L'évolution de la fluorescence est représentée sous forme de  $\Delta Rn$  (où  $\Delta Rn$  symbolise la variation de fluorescence par rapport à une fluorescence basale) en fonction du nombre de cycles de PCR. Après un certain nombre de cycles, la quantité de produit amplifié augmente et l'émission de fluorescence devient plus importante. La méthode d'analyse consiste à fixer un seuil de fluorescence déterminé de manière à ce que la quantité de produit amplifié soit, à ce stade, en phase d'augmentation exponentielle sur une représentation graphique logarithmique. La quantification des ARN est réalisée en calculant le paramètre Ct. Celui-ci correspond au nombre de cycles nécessaires pour que le niveau de fluorescence atteigne un cycle seuil fixé (Fig.48). Plus un échantillon possède un nombre élevé de copies initiales de la séquence ARN considérée, plus la valeur de Ct sera faible. Pour nos études, nous quantifions les ARN des différents marqueurs par rapport à un gène de référence : HPRT

(Hypoxanthine Phospho-Ribosyl Transférase). Les résultats sont exprimés sous forme de  $2^{-\Delta Ct}$  et représentent l'expression des ARNm cibles par rapport à HPRT (Livak & Schmittgen, 2001).

L'appareil utilisé est le thermocycleur ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). Ce système comprend l'appareil PCR ainsi qu'une caméra détectant la fluorescence qui est pilotée par un ordinateur. Les résultats sont analysés grâce au logiciel SDS 2.1 software (Applied Biosystems).

## IV- ÉTUDE BIOCHIMIQUE

### 1- Western blot

#### 1- Préparation des extraits protéiques

Les échantillons bronchiques humains ou les culots de cellules sont recouverts de tampon Ripa (PBS 1X, Nonidet P40 1%, déoxycholate de sodium 0,5% et SDS 0,1%) en présence d'inhibiteurs de protéase (Proteases inhibitor cocktail, Sigma, France). Les tissus sont préalablement broyés dans le Ripa. L'incubation dans le Ripa dure 30 minutes à 4°C. Puis les homogénats sont centrifugés à 10 000 g durant 10 minutes à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires ainsi que les noyaux qui vont former le culot. Le surnageant contient les protéines en solution. Une seconde centrifugation peut être nécessaire pour obtenir un surnageant limpide. Les concentrations protéiques des surnageants ainsi obtenus, correspondant à des lysats cellulaires totaux, sont évaluées grâce à un dosage colorimétrique utilisant le réactif de Bradford (Biorad, France) par lecture automatisée de l'absorbance à 595 nm sur appareil Wallac 1420 VICTOR<sup>2</sup>™ (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA).

#### 2- Gels de protéines et analyse par immuno-empreinte

Les gels de protéines sont constitués d'une partie résolutive et d'une partie dite de concentration qui sont coulées successivement. La composition des gels est indiquée dans le tableau 4.

Composition	Gel résolusif	Gel de concentration
Eau	4 ml	3,4 ml
Acrylamide 30%	3,3 ml	830 µl
Tris	2,5 ml de solution à 1,5 M pH 8,8	630 µl de solution à 1 M pH 6,8
SDS 10%	100 µl	50 µl
Persulfate d'ammonium 10%	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	5 µl

**Tableau 4. Composition des gels de protéines.**

SDS : sodium dodecyl sulfate

TEMED : N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine

Les échantillons protéiques sont dilués avec un volume équivalent de tampon de charge (Tris/HCl 50 mM pH = 6,8, DTT 100 mM, SDS 2%, glycérol 10% et Bleu de bromophénol 0,1 %). Le tout est dénaturé 10 minutes à 100°C et mis à migrer (tampon de migration : Tris 25 mM, glycine 250 mM, pH=8,3 et SDS 0,1%) à 80 V tant que les protéines sont dans le gel de concentration puis à 100 V dans le gel de résolution. Suite à un transfert sur une membrane de nitrocellulose (HybondCsuper, Amersham, France), les membranes sont incubées 30 minutes à température ambiante avec 5% de lait dans du TBS (Tris buffer saline) et Tween 0,1% (TBST). Cette étape a pour but d'éviter une fixation non spécifique des anticorps utilisés dans la suite du protocole.

La dilution des anticorps primaires dans le TBST varie selon l'anticorps utilisé. De même, le temps et la température d'incubation de la membrane dépendent de l'anticorps primaire. Après l'incubation avec l'anticorps primaire, la membrane est rincée trois fois pendant 10 minutes à température ambiante en TBST. Puis elle est incubée, toujours à température ambiante, dans une solution d'anticorps secondaire couplé à une enzyme HRP (Horse radish peroxidase) (Sigma, France) dilué au 1/10 000<sup>ème</sup> en TBST/lait 1%. L'anticorps secondaire est dirigé contre l'espèce qui a servi au développement de l'anticorps primaire. Les membranes sont ensuite révélées par chimiluminescence sur film photographique à l'aide du kit Immobilon Western (Millipore, France).

### 3- Quantification de l'expression protéique

La densité des bandes des films photographiques est calculée par un logiciel d'analyse d'images, MetaMorph (Universal Imaging). Pour chaque protéine, un ratio est calculé par rapport à l'intensité d'une protéine de référence, la GAPDH. À partir des valeurs ainsi obtenues au cours d'expériences successives, une moyenne est calculée pour chaque échantillon de tissu. Puis, pour les tissus des patients contrôles, une moyenne est calculée à partir des moyennes des différents individus. Cette moyenne est ensuite normalisée à 1. Ainsi, pour le groupe d'individus mucoviscidosiques, la moyenne est calculée en fonction de la normalisation du groupe contrôle.

Pour chaque protéine étudiée, la significativité de la différence observée entre les groupes de cellules ou de tissus est analysée par un test *t* de Student non apparié.

## **2- Immunomarquage**

### **1- Sur les lignées cellulaires**

Pour les immunomarquages, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre disposées au fond d'une plaque 6 puits. Le milieu de culture est d'abord retiré puis les cellules sont rincées au PBS et fixées dans du paraformaldehyde dilué à 4% dans le PBS pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules fixées sont alors rincées avec du PBS et les lamelles sont mises à incuber en chambre humide avec l'anticorps primaire dilué dans le PBS supplémenté en BSA 2% (Bovine serum albumin). La durée et la température d'incubation dépendent de l'anticorps primaire. Après cette incubation, les lamelles sont rincées trois fois en PBS et mise à incuber pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et dilué dans le PBS-BSA 2%. Les lames sont alors rincées avec du PBS et montées en PBS-glycérol 50% pour observation au microscope à épifluorescence ou au microscope confocal.

### **2- Sur les tissus bronchiques humains**

Les lames de tissus bronchiques humains contrôles et mucoviscidosiques sont obtenues auprès du service d'anatomo-pathologie de l'hôpital Laënnec de Nantes. Ces coupes de tissus sont incluses en paraffine. Lors de leur utilisation pour immunomarquage, les lames sont préalablement déparaffinées et réhydratées respectivement par deux bains de 10 minutes dans du xylène et par bains successifs en quantité décroissante d'alcool, et pour finir par un bain de PBS. Les peroxydases endogènes sont alors inhibées par un bain de 10 minutes à température ambiante dans du PBS contenant 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les lames sont ensuite incubées 30 minutes à température ambiante avec 10% de sérum normal de l'espèce dans laquelle a été produit l'anticorps secondaire qui sera utilisé. Après trois rinçages en PBS, une incubation en chambre humide est effectuée avec l'anticorps primaire dilué dans le PBS avec 1,5% du même sérum normal. Cette incubation est réalisée à température ambiante mais sa durée dépend de l'anticorps primaire. Après trois rinçages, les lames sont incubées en chambre humide pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à HRP dilué dans le PBS avec 1,5% du même sérum normal. Les lames sont rincées et révélées avec le kit DAB SK-4100 (Vector, France) puis colorées à l'hématoxyline pour marquer les noyaux. Les lames sont alors montées en milieu DPX (Sigma, France) pour une observation en microscopie optique.

## V- ÉTUDE FONCTIONNELLE : MICROCYTOFLUORIMÉTRIE

Le transport des ions chlorures à travers la membrane plasmique des cellules peut être mesuré par différentes techniques comme les efflux de  $^{36}\text{Cl}$ , le patch-clamp et la microcytofluorimétrie. L'avantage de la microcytofluorimétrie réside dans la possibilité de travailler simultanément sur plusieurs cellules. Sa grande sensibilité lui permet également de détecter de très faibles variations de la concentration intracellulaire en ions chlorures.

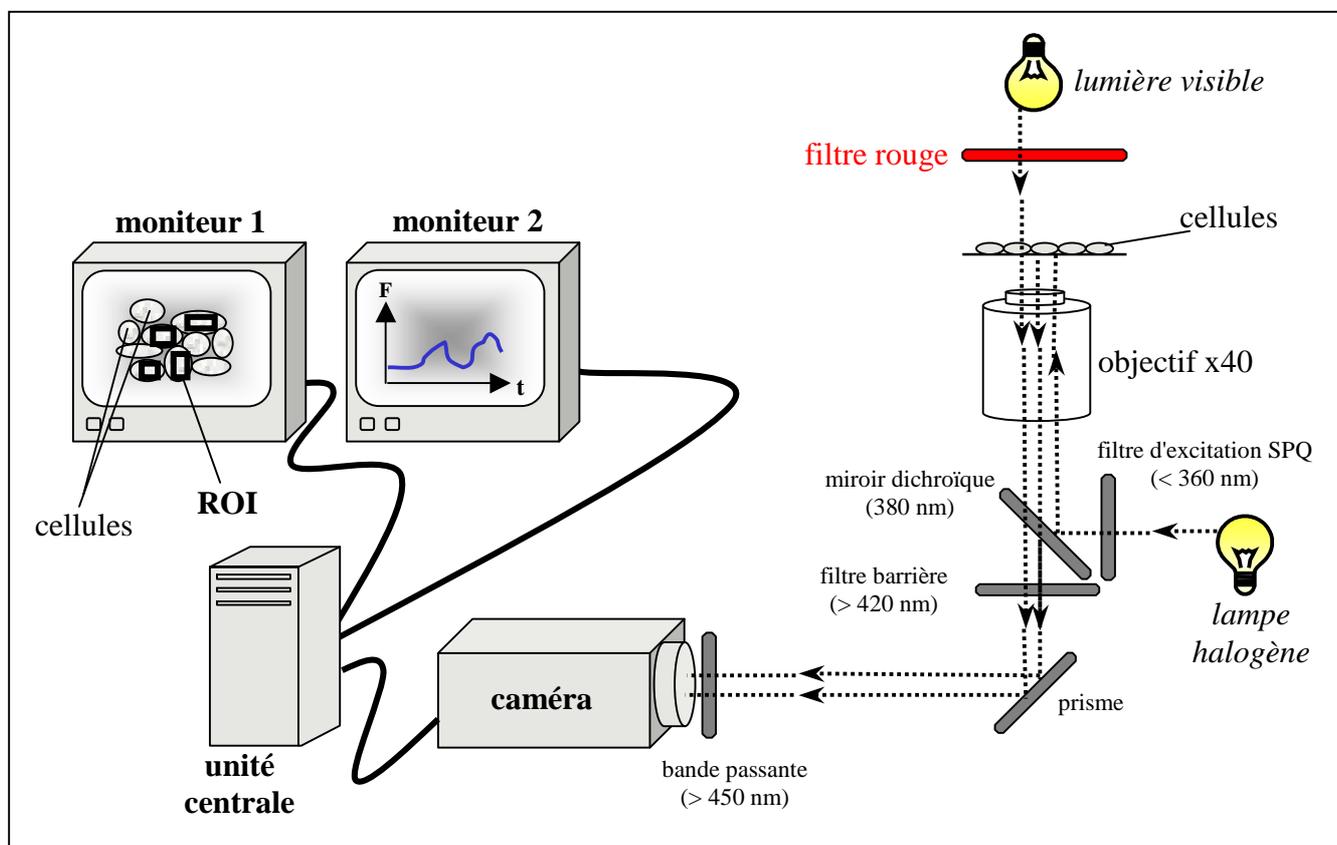
Le 6-méthoxy-N-(3-sulfopropyl)-quinolinium (SPQ) est une sonde fluorescente qui est incorporée aux cellules. Le SPQ est excité à une longueur d'onde comprise entre 320 et 350 nm et il émet à une longueur d'onde de 450 nm. La fluorescence du SPQ est sensible aux halogénures qui provoquent des extinctions de sa fluorescence (Illsley & Verkman, 1987). Ces extinctions varient selon l'halogénure considéré. Le classement des halogénures réalisé selon leur puissance d'extinction de la fluorescence du SPQ est le suivant : ions iodures > ions bromures > ions chlorures. Le thiocyanate, le glucanate et le citrate font également varier la fluorescence du SPQ. Par contre, le SPQ est insensible aux ions nitrates, bicarbonates, phosphates, sodiques, calciques, potassiques ainsi qu'aux variations de pH (Illsley & Verkman, 1987). Le SPQ est couramment utilisé pour caractériser les cellules exprimant CFTR.

### 1- Dispositif expérimental

L'installation de microcytofluorimétrie est composée d'un microscope à épifluorescence (DIAPHOT-TMD, Nikon) couplé à un système de « video imaging » (Fig.49). La source de lumière est une lampe halogène de 100 Watts. Le dispositif est conçu de manière à permettre l'observation à la fois du FITC dans les noyaux des cellules micro-injectées (utilisée pour repérer les cellules injectées) et celle du SPQ (mesure des efflux d'ions chlorures).

Pour l'observation du FITC, la lumière incidente est filtrée par un filtre d'excitation qui laisse passer le spectre d'excitation du fluorochrome (450-490 nm). Cette lumière arrive sur un miroir dichroïque (DM510) qui réfléchit la lumière de longueur d'onde inférieure à 510 nm. Ainsi, toute la lumière qui a traversé le filtre d'excitation est réfléchi vers les cellules par le miroir dichroïque. Le FITC contenue dans les cellules est excité et émet un spectre de longueur d'onde autour des 530 nm. La quasi-totalité de ce spectre traverse le miroir dichroïque qui laisse passer les longueurs d'onde supérieures à 510 nm, puis le filtre barrière

qui laisse passer les longueurs d'ondes supérieures à 520 nm. Cette lumière est réfléchiée par un prisme qui la conduit jusqu'à la caméra vidéo (Extended ISIS camera system, Photonic Science).



**Figure 49. Représentation schématique du montage expérimental de microcytofluorimétrie adapté à la sonde SPQ.**

ROI : region of interest.

Pour les mesures de fluorescence en microcytofluorimétrie, le principe est le même, mais les caractéristiques du filtre d'excitation (bande-passante à 360 nm), du miroir dichroïque (DM 380) et du filtre barrière (420 nm) sont adaptées au SPQ (Fig.49). Devant la caméra, un filtre qui possède une bande passante à 450 nm permet d'éliminer toute source de lumière contaminant celle émise par le SPQ. La lumière qui arrive jusqu'à la caméra est alors amplifiée et analysée par le programme informatique Fluo3b (IMSTAR). Ce programme permet de suivre, pour chaque cellule sélectionnée sur l'écran de contrôle et indépendamment des cellules voisines, les variations de l'intensité de la fluorescence F du SPQ en fonction du temps.

## 2- Protocole expérimental

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes de Pétri dont le fond est percé afin d'y placer une lamelle de verre qui adhère grâce à l'application d'une graisse infusible. Les boîtes de cellules sont étudiées 24 heures après leur éventuelle transfection. Elles sont chargées en SPQ par choc hypotonique : les cellules sont incubées à 37°C pendant 10 à 15 minutes avec un mélange volume à volume constitué d'une part d'une solution de SPQ 20 mM diluée dans une solution de tyrode (tableau 5) sans calcium, et d'autre part d'eau stérile.

TYRODE	
NaCl	145 mM
KCl	4 mM
HEPES	5 mM
Glucose	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
pH (ajusté avec NaOH)	7,4

**Tableau 5. Composition de la solution de tyrode.**

Immédiatement après la charge en SPQ, la boîte de Pétri est insérée dans une chambre de perfusion maintenue à 37°C. Les cellules sont perfusées en continu par une solution de tyrode également chauffé à 37°C. Les cellules injectées sont repérées sous microscope grâce au FITC-dextran présent dans leur noyau. Puis le dispositif est modifié afin de pouvoir mesurer la fluorescence du SPQ. Les régions correspondant aux différentes cellules à étudier ou ROI (Regions Of Interest) sont sélectionnées. La fonctionnalité du canal CFTR est évaluée par sa capacité à transporter les ions iodures (I<sup>-</sup>) et nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Les cellules sont perfusées localement par gravité grâce à un système de tubes en Tygon (diamètre interne de 0,25 mm) appelé éjecteur. Chaque tube est relié à une seringue contenant les solutions riches en ions I<sup>-</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, équivalentes à la solution de tyrode dans laquelle les ions Cl<sup>-</sup> sont remplacés par les ions I<sup>-</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (tableau 6).

Solution $\text{NO}_3^-$		Solution $\text{I}^-$	
$\text{NaNO}_3^-$	145 mM	$\text{NaI}$	145 mM
$\text{KNO}_3^-$	4 mM	$\text{KNO}_3^-$	4 mM
HEPES	5 mM	HEPES	5 mM
Glucose	5 mM	Glucose	5 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1 mM	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1 mM
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	1 mM	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	1 mM
pH (ajusté avec NaOH)	7,4	pH (ajusté avec NaOH)	7,4

Tableau 6. Composition des solutions de perfusion utilisées pour les expériences de microcytofluorimétrie.

Les cellules sont initialement perfusées par une solution riche en ions  $\text{I}^-$ . Ceux-ci étant absents du milieu intracellulaire, ils entrent dans les cellules selon leur gradient physico-chimique, ce qui provoque une extinction de la fluorescence SPQ (Fig.50A). Après avoir atteint leur équilibre ionique (fluorescence  $F$  stabilisée :  $F$  minimale), les ions  $\text{I}^-$  extracellulaires sont remplacés par des ions  $\text{NO}_3^-$  qui vont alors entrer dans les cellules. Pour ce faire, un éjecteur contenant une solution riche en  $\text{NO}_3^-$  est placé au-dessus de la zone étudiée. Les ions  $\text{NO}_3^-$  vont chasser les ions  $\text{I}^-$  d'autant plus vite que la perméabilité des cellules aux ions halogénures est grande (Fig.50B).

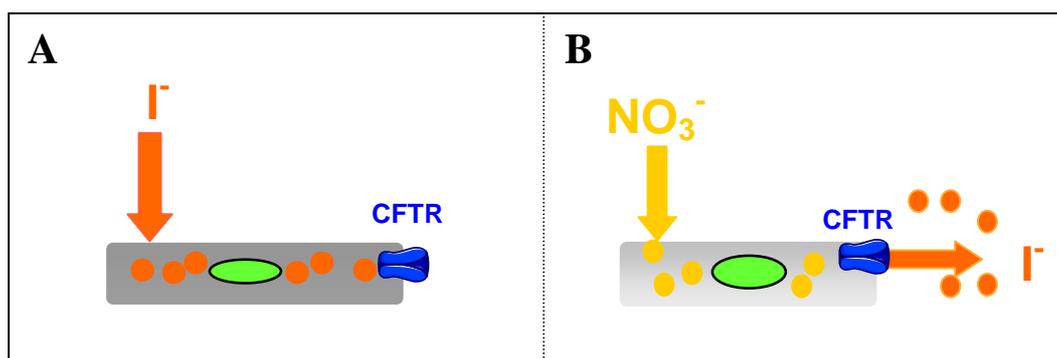


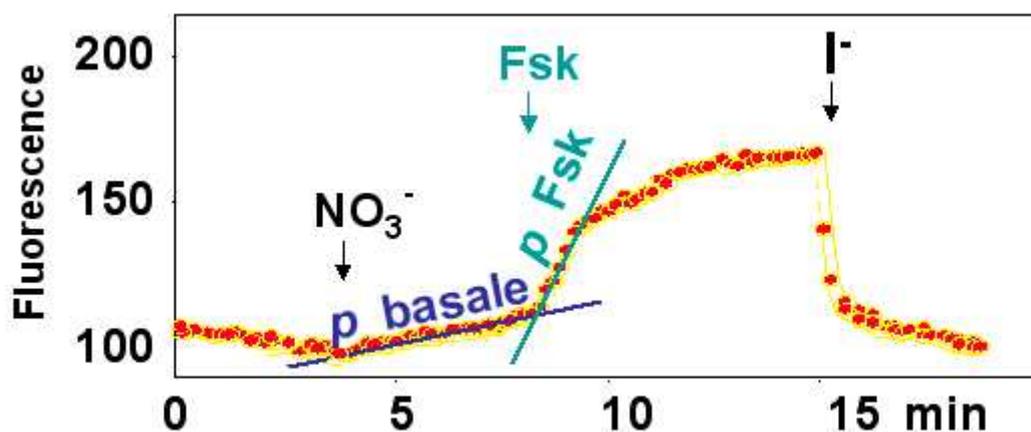
Figure 50. Représentation schématique de l'influence de la solution de perfusion sur l'intensité de fluorescence de la sonde SPQ.

**A** : perfusion extracellulaire d'ions iodures ( $\text{I}^-$ ) qui entrent dans la cellule selon leur gradient physico-chimique et font diminuer la fluorescence de la sonde SPQ.

**B** : perfusion extracellulaire d'ions nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) qui entrent dans la cellule selon leur gradient physico-chimique, chassent les ions  $\text{I}^-$  *via* CFTR, entraînant ainsi une augmentation de la fluorescence.

L'échange des ions  $\Gamma$  et  $\text{NO}_3^-$  entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire sollicite les canaux chlorures des cellules mais aussi leurs transporteurs endogènes. Parmi ceux-ci, le co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  est majoritairement impliqué. Afin de mesurer principalement les échanges ioniques imputables aux canaux chlorures, le co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  est inhibé par addition de 10  $\mu\text{M}$  de bumétanide (Sigma, France) dans les solutions de perfusion. La sortie des ions  $\Gamma$  des cellules entraîne une augmentation de la fluorescence  $F$  du SPQ (car la sonde SPQ est insensible aux ions  $\text{NO}_3^-$ ) (Fig.50B). Quand  $F$  est maximale, les cellules sont à nouveau perfusées par la solution  $\Gamma$  et la fluorescence  $F$  diminue.

La cinétique de variation de la fluorescence du SPQ est donc en corrélation avec le nombre de canaux chlorures ouverts : plus il y aura de canaux chlorures ouverts, plus la variation de la fluorescence sera grande. Cette cinétique correspond à la pente initiale de  $F$  ( $dF/dt$  ou  $p$ ) lors de la perfusion des ions  $\text{NO}_3^-$  : l'activation de CFTR correspondant à une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions est corrélée avec une augmentation de la pente  $p$ , tandis que son inhibition s'accompagne d'une diminution de  $p$ . Lors de nos expérimentations, la valeur de la pente basale ( $p$  basale) correspondant à l'activité basale de CFTR est calculée (Fig.51). L'ajout de molécules activatrices ou inhibitrices de l'activité de CFTR permet d'obtenir des pentes plus fortes ou plus faibles respectivement. Ainsi, la forskoline (Fsk), un agent activateur de l'adénylate cyclase, permet l'augmentation du taux d'AMPC intracellulaire et entraîne l'activation de CFTR par la PKA. De cette façon, une augmentation rapide de la fluorescence  $F$  du SPQ caractérisée par une pente forte ( $p$  Fsk) est obtenue (Fig.51).



**Figure 51.** Cinétique des variations de fluorescence de la sonde SPQ.

$p$  basale : pente basale

$p$  Fsk : pente en présence de forskoline

### 3- Analyse des résultats

Les valeurs des pentes  $p$  mesurées dépendent à la fois de la perméabilité aux ions iodures et de la concentration en SPQ dans les cellules. Pour que les pentes mesurées soient comparables d'une cellule à l'autre et ne dépendent pas de la charge en SPQ, le niveau de fluorescence minimale est normalisé à 100. Ainsi, les valeurs absolues de la fluorescence du SPQ ( $F$ ) mesurées dans chaque cellule sont standardisées selon la formule :  $F' = F/F_0 \times 100$ . Dans cette formule,  $F'$  est la fluorescence relative et  $F_0$ , l'intensité de la fluorescence du SPQ en présence d'ions  $I^-$ . Dans ces conditions, nous obtenons une très bonne reproductibilité des valeurs de pentes pour les cellules étudiées dans des conditions similaires. La normalisation est opérée automatiquement par un programme élaboré avec Microsoft qBASIC. Les pentes  $p$  sont alors calculées par régression linéaire (CACricket Graph III) en sélectionnant au moins trois points successifs immédiatement après le changement de solution de perfusion. Les résultats sont présentés sous forme de pente  $p$  moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM) (Fig.51).

La comparaison des pentes  $p$  obtenues par microcytofluorimétrie est effectuée suivant un test  $t$  de Student apparié si les deux pentes à comparer sont issues des mêmes cellules, et non apparié si les pentes sont obtenues sur des cellules différentes.

## **RÉSULTATS**

# I- NHE-RF1 RESTAURE LA LOCALISATION ET LA FONCTION DE $\Delta$ F508.

## 1- Introduction

La protéine NHE-RF1 se lie par l'intermédiaire de ses domaines PDZ à l'extrémité C-terminale de CFTR (Hall *et al.*, 1998 ; Short *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1998). Cette interaction a des implications à la fois structurales et fonctionnelles. En effet, NHE-RF1 peut lier de multiples partenaires protéiques dont certains influencent la stabilité structurale du complexe. C'est le cas de l'eitrine qui permet l'ancrage au cytosquelette d'actine (Reczek *et al.*, 1997). Mais la stabilité du complexe peut également être influencée par la fixation d'une autre protéine membranaire par le second domaine PDZ de NHE-RF1, formant des complexes homo ou hétérodimériques, voire même multimériques par auto-assemblage de plusieurs protéines NHE-RF1. Sur le plan fonctionnel, NHE-RF1 joue un rôle important en plaçant à proximité de CFTR, des protéines clés de la régulation de son activité, comme la PKA et la PKC (Liedtke *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2000).

La double implication structurale et fonctionnelle de NHE-RF1 vis-à-vis de CFTR a été étudiée de façon indépendante. Ainsi, la suppression de l'interaction avec NHE-RF1 entraîne une forte diminution de l'expression membranaire apicale de CFTR, démontrant son rôle majeur dans l'adressage et la stabilité apicale de CFTR (Moyer *et al.*, 1999 ; Moyer *et al.*, 2000). Par ailleurs, une augmentation progressive de la concentration de NHE-RF1 entraîne l'apparition d'un état de forte conductance du canal CFTR, soulignant l'implication de NHE-RF1 dans l'activité de CFTR (Raghuram *et al.*, 2001).

L'influence de NHE-RF1 sur la protéine CFTR sauvage est donc bien décrite. En revanche, son éventuelle influence sur le mutant  $\Delta$ F508 n'a pas été étudiée. En considérant l'ensemble de ces données, le but de la présente étude était de déterminer biochimiquement et fonctionnellement l'effet d'une surexpression de NHE-RF1 sur la maturation, l'adressage apical et l'activité chlorure de  $\Delta$ F508 dans des systèmes cellulaires d'expression transitoire.

NHE-RF1 protein rescues DeltaF508-CFTR function.

[Bossard F, Robay A, Toumaniantz G, Dahimene S, Becq F, Merot J, Gauthier C.](#)

**Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 May;292(5):L1085-94.**

## 2- Résultats et discussion

Nos travaux démontrent que la surexpression de NHE-RF1 augmente l'activité chlorure basale de CFTR sauvage dans les cellules A549. Ce résultat est en accord avec le modèle selon lequel des concentrations croissantes de NHE-RF1 stimulent l'activité chlorure de la protéine CFTR en augmentant sa probabilité d'ouverture (Raghuram *et al.*, 2001). En revanche, NHE-RF1 n'a pas d'effet sur l'activité basale de CFTR dans les cellules polarisées MDCK. Ce résultat est également en accord avec ceux de la littérature montrant que l'interaction de CFTR avec NHE-RF1 n'est pas indispensable à sa localisation et sa fonction apicales (Benharouga *et al.*, 2003 ; Ostedgaard *et al.*, 2003 ; Haggie *et al.*, 2004). D'ailleurs, ce résultat fonctionnel dans les cellules MDCK est à corrélérer avec nos résultats de quantification d'immunomarquage ne montrant pas de différence significative entre l'expression apicale de CFTR sauvage en absence ou en présence de NHE-RF1. En revanche, d'autres travaux montrent que l'interaction avec NHE-RF1 est indispensable à la localisation et la fonction apicales de CFTR (Moyer *et al.*, 1999 ; Moyer *et al.*, 2000). Ces discordances peuvent provenir des modèles cellulaires utilisés dans ces études respectives. Cependant, dans les deux lignées cellulaires, A549 et MDCK, la surexpression de NHE-RF1 augmente l'activité chlorure de CFTR stimulée par l'activateur de l'adénylate cyclase, la forskoline (Fsk). Cet effet est probablement dû à la propriété de NHE-RF1 à se lier à l'eitrine qui fixe la PKA, plaçant ainsi cette kinase régulatrice à proximité de CFTR, accélérant ainsi son activation après le recrutement de la voie adénylate cyclase / AMPc / PKA.

Nous montrons ensuite que la surexpression de NHE-RF1 restaure la localisation et la fonction de la protéine mutante  $\Delta F508$ . Cette conclusion résulte de la corroboration de plusieurs arguments. D'abord, la micro-injection des cellules avec  $\Delta F508$  seul entraîne une activité chlorure apicale très faible dont la stimulation par la Fsk ne parvient pas à atteindre le niveau d'activité basale observé avec CFTR sauvage. En revanche, les cellules micro-injectées avec  $\Delta F508$  et NHE-RF1 présentent des activités chlorures basale et stimulée par la Fsk significativement augmentées. Dans ces conditions, la stimulation par la Fsk entraîne une activité chlorure supérieure à l'activité basale de la protéine CFTR sauvage. Ensuite, lorsqu'un oligonucléotide complémentaire de l'ARNm de NHE-RF1 est micro-injecté simultanément avec NHE-RF1 et  $\Delta F508$ , l'effet positif de NHE-RF1 sur l'activité chlorure du mutant  $\Delta F508$  est supprimé. De plus, les cellules polarisées MDCK co-transfectées avec NHE-RF1 et  $\Delta F508$  présentent une localisation membranaire apicale de  $\Delta F508$ , alors que la transfection avec

$\Delta F508$  seul n'entraîne aucun marquage membranaire. Enfin, la suppression sur le mutant  $\Delta F508$  de la séquence C-terminale d'interaction avec les domaines PDZ de NHE-RF1, abolit la localisation membranaire lorsque NHE-RF1 est sur-exprimé. L'effet de NHE-RF1 sur le mutant  $\Delta F508$  n'est pas la conséquence d'une augmentation globale de l'adressage des protéines membranaires de la cellule. Nous avons vérifié cette hypothèse en utilisant un autre canal ionique membranaire, le canal potassique KCNQ1, pour lequel nous disposons d'un mutant qui, comme  $\Delta F508$ , est incapable d'atteindre la membrane plasmique apicale. Or, contrairement à  $\Delta F508$ , en présence de NHE-RF1 la localisation membranaire apicale de ce mutant de KCNQ1 n'est pas restaurée et il reste exprimé dans les compartiments cytosoliques.

Les mécanismes impliqués dans la capacité de NHE-RF1 à restaurer la localisation et la fonction du mutant  $\Delta F508$  restent à déterminer. Néanmoins, il est envisageable que NHE-RF1 interagisse au niveau du RE avec les protéines chaperonnes impliquées dans la maturation de CFTR : Hsc70, Hsp90 et la calnexine. NHE-RF1 pourrait également intervenir au niveau de la membrane apicale en y stabilisant la faible proportion de mutant  $\Delta F508$  qui aurait mûri correctement et atteint la surface cellulaire.

## II- EXPRESSION DES RÉCEPTEURS $\beta$ -ADRÉNERGIQUES ET DE NHE-RF1 DANS LES POUMONS HUMAINS

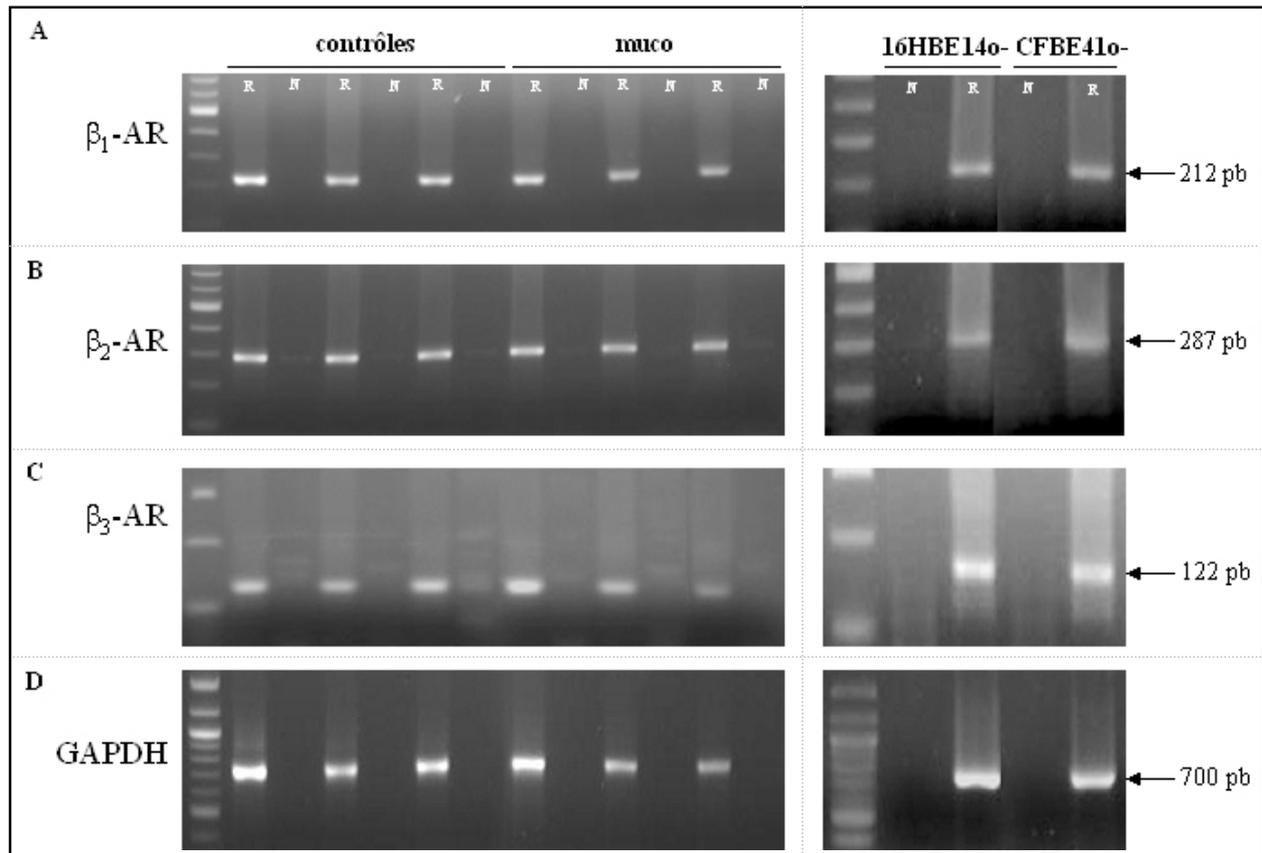
### 1- Introduction

Au niveau pulmonaire, les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -adrénergiques sont bien identifiés et sont décrits au niveau épithélial comme régulateurs de la motilité ciliaire, des transports électrolytiques en étant notamment modulateurs de la fonction de CFTR. Concernant le troisième sous-type de récepteur  $\beta$ -adrénergique, il est très étudié dans les mécanismes de thermogénèse et de lipolyse adipocytaires. Sa présence est également attestée au moins fonctionnellement dans différents organes tels que les muscles lisses (Koike *et al.*, 1997 ; Tamaoki *et al.*, 1998 ; Fujimura *et al.*, 1999 ; Cirino *et al.*, 2003), l'endothélium (Asano *et al.*, 1997 ; Trochu *et al.*, 1999 ; Steinle *et al.*, 2003), le cœur (Gauthier *et al.*, 1996). Cependant, jusqu'à présent, il n'a pas été identifié dans les poumons humains, aussi bien au niveau des transcrits (Krief *et al.*, 1993 ; Mak *et al.*, 1996) qu'au niveau fonctionnel (Newnham *et al.*, 1993) alors que sa présence est avérée dans les poumons de différents mammifères (porc, furet, lapin, chien) (McNeel & Mersmann, 1999 ; Takeyama *et al.*, 1993 ; Tamaoki *et al.*, 1993a ; Webber & Stock, 1992).

Par ailleurs, notre équipe a démontré dans des systèmes cellulaires d'expression transitoire que le  $\beta_3$ -AR régule l'activité de CFTR (Leblais *et al.*, 1999) par une nouvelle voie impliquant les MAPK ERK1/2 (Robay *et al.*, 2005). La volonté de savoir si cette régulation de CFTR par le  $\beta_3$ -AR existe physiologiquement nous a conduits à vérifier la présence de ce récepteur dans les bronches humaines ainsi que dans des cellules épithéliales bronchiques humaines. Une diminution d'expression des  $\beta$ -ARs étant décrite dans la mucoviscidose (Sharma & Jeffery, 1990), nous avons comparé l'expression de chacun des trois sous-types de  $\beta$ -AR dans les bronches contrôles et mucoviscidosiques. Sachant que NHE-RF1 est impliqué dans l'adressage et la fonction de CFTR, nous avons également comparé son expression dans les deux groupes de patients.

## 2- Résultats

Afin de déterminer la présence des trois sous-types de  $\beta$ -ARs dans les bronches humaines contrôles et mucoviscidosiques ainsi que dans nos deux lignées épithéliales bronchiques humaines (16HBE14o- et CFBE41o-), nous avons dans un premier temps recherché la présence des transcrits.



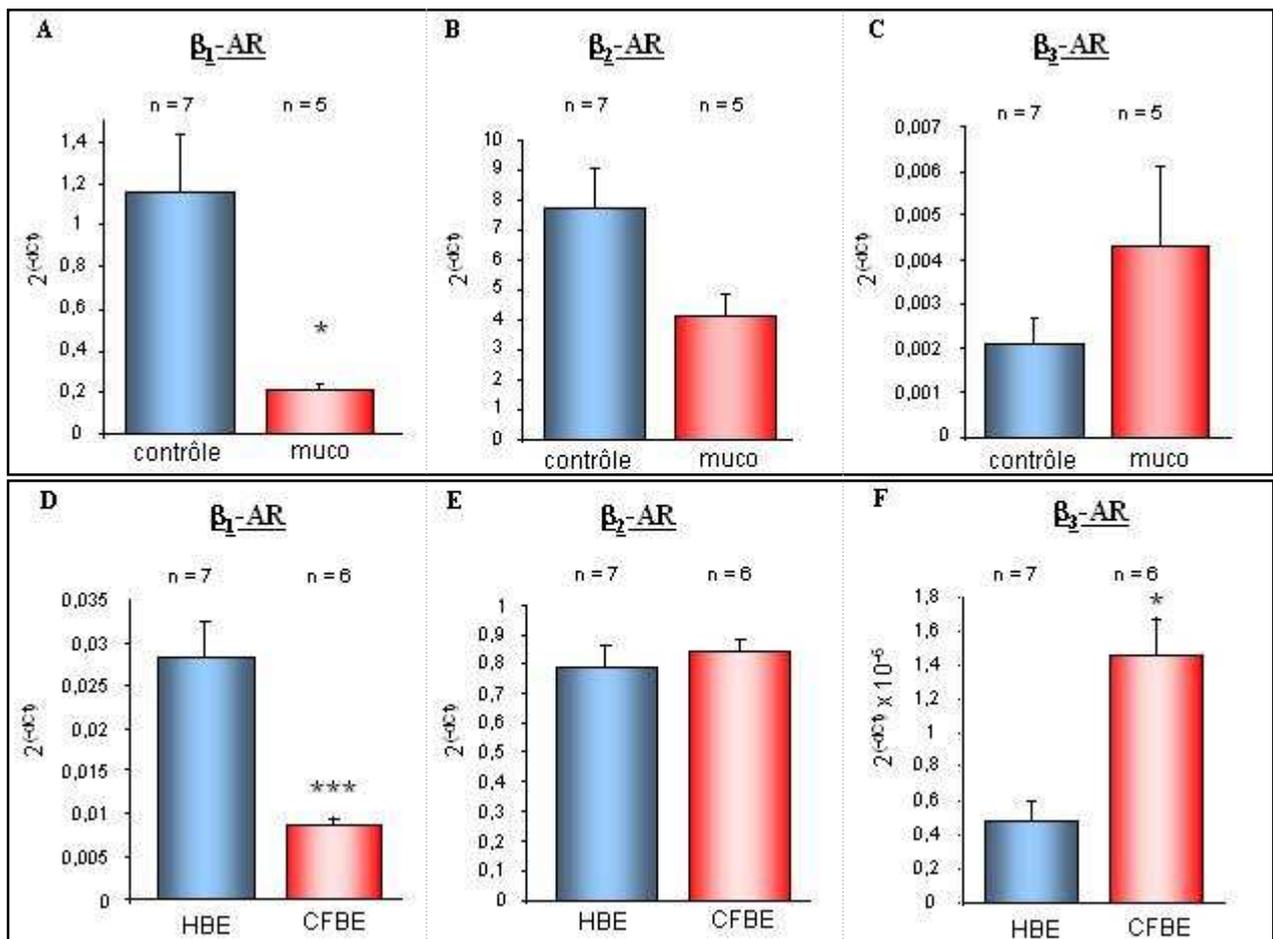
**Figure 1.** Expériences de réaction en chaîne de polymérase (PCR) après réverse-transcription des ARNs totaux issus de 3 bronches humaines contrôles et 3 bronches humaines mucoviscidosiques (panneaux de gauche) et des lignées cellulaires épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o- (panneaux de droite). PCR réalisées avec les sondes spécifiques de l'ADNc du (A)  $\beta_1$ -AR, (B)  $\beta_2$ -AR, (C)  $\beta_3$ -AR et (D) de la GAPDH.

R : échantillon réverse-transcrit.

N : échantillon non réverse-transcrit.

La figure 1 représente les résultats de PCR attestant la présence de l'ARNm des trois sous-types de  $\beta$ -ARs aussi bien dans les tissus que dans les cellules. Par ailleurs, ces ARNm sont retrouvés à la fois dans les conditions contrôles et mucoviscidosiques.

Après avoir validé la présence des transcrits  $\beta$ -ARs dans les tissus et cellules bronchiques humaines, nous avons recherché d'éventuelles différences de taux d'ARNm entre les groupes contrôles et mucoviscidosiques. La figure 2 regroupe les résultats obtenus en PCR quantitative en temps réel pour  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ -AR dans les tissus bronchiques humains et les lignées épithéliales bronchiques humaines contrôles et mucoviscidosiques.



**Figure 2. Résultats de PCR quantitative en temps réel réalisée sur tissus bronchiques humains contrôles et mucoviscidosiques (panneau du haut), et sur les 2 lignées épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o- (panneau du bas). Les expériences ont été effectuées avec des sondes spécifiques de l'ADNc du (A, D)  $\beta_1$ -AR, (B, E)  $\beta_2$ -AR et (C, F)  $\beta_3$ -AR.**

HBE : cellules 16HBE14o-.

CFBE : cellules CFBE41o-.

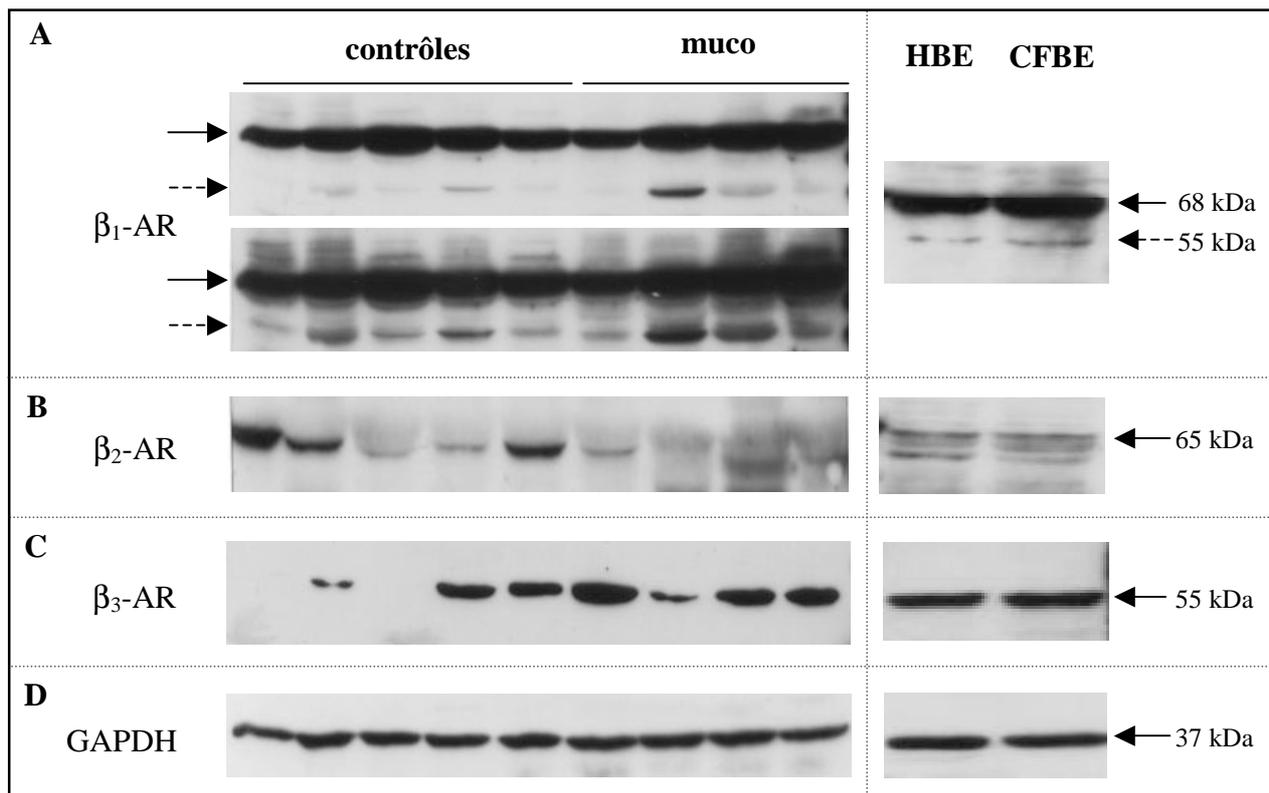
\* :  $p < 0,05$

\*\*\* :  $p < 0,0001$

Concernant les tissus bronchiques, nous pouvons constater une diminution significative de l'ARNm du  $\beta_1$ -AR dans la mucoviscidose ( $p = 0,019$  ; Fig.2A). Les ARNm  $\beta_2$ -AR et  $\beta_3$ -AR ne varient pas de façon significative entre les deux groupes de patients (Fig.2B et 2C).

Les fortes hétérogénéités individuelles au sein d'un même groupe et la taille relativement faible de chacun de ces deux groupes peuvent être à l'origine de ce manque de significativité. Dans les lignées épithéliales bronchiques humaines, une forte diminution des taux d'ARNm  $\beta_1$ -AR est observée dans les cellules homozygotes pour  $\Delta F508$  ( $p = 0,0001$  ; Fig.2D). Ce résultat confirme celui obtenu dans les tissus mucoviscidosiques. Aussi, la tendance à l'augmentation des ARNm  $\beta_3$ -AR dans les tissus mucoviscidosiques est confirmée de façon significative dans les lignées cellulaires ( $p = 0,024$  ; Fig.2F). En revanche, la tendance à la diminution des taux d'ARNm  $\beta_2$ -AR qui est presque significative dans les bronches mucoviscidosiques ( $p = 0,055$  ; Fig.2B) n'est pas retrouvée dans la lignée épithéliale bronchique CFBE41o- en comparaison avec les cellules 16HBE14o- ( $p = 0,57$  ; Fig.2E).

La présence des trois protéines  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ -AR a ensuite été investiguée dans les tissus et les lignées cellulaires bronchiques.



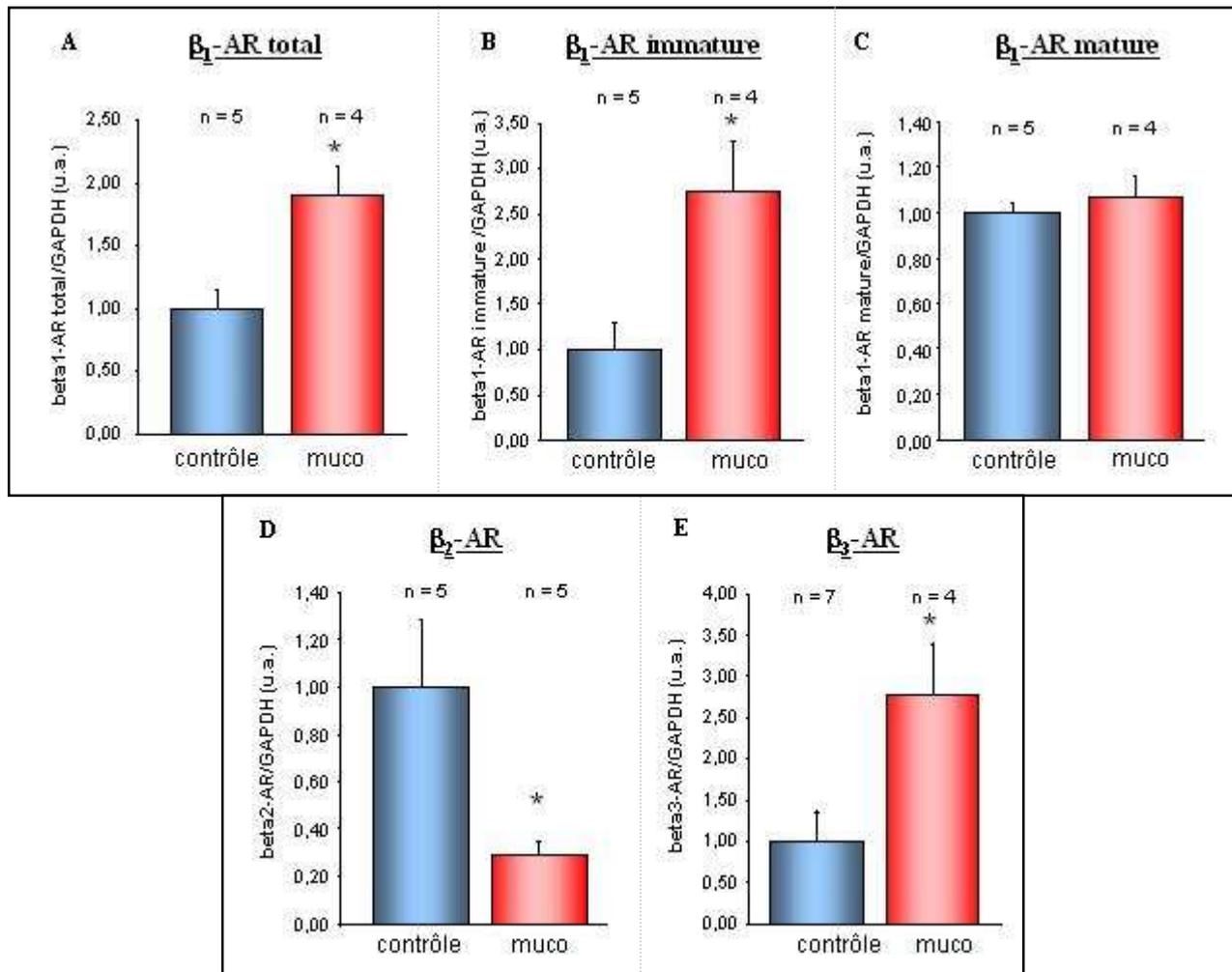
**Figure 3.** Western blots réalisés à partir de 5 bronches humaines contrôles et 4 bronches humaines mucoviscidosiques (panneaux de gauche) et à partir des lignées épithéliales bronchiques humaines (panneaux de droite). Western blots réalisés avec un anticorps primaire dirigé contre (A) le  $\beta_1$ -AR, (B) le  $\beta_2$ -AR, (C) le  $\beta_3$ -AR et (D) la GAPDH.

HBE : cellules 16HBE14o-  
CFBE : cellules CFBE41o-

--▶ forme partiellement glycosylée du  $\beta_1$ -AR

La figure 3 démontre l'expression des trois sous-types de  $\beta$ -ARs dans les tissus bronchiques et dans les lignées épithéliales bronchiques. Cependant, essentiellement dans les tissus bronchiques, des disparités sont observées. Ainsi, d'une manière générale, une variabilité d'expression est observée au sein des individus d'un même groupe mais aussi entre les deux groupes de patients. Plus particulièrement, pour le  $\beta_1$ -AR, l'expression de la forme mature (68 kDa) semble peu modifiée entre les individus contrôles et mucoviscidosiques (Fig.3A, panneau en haut à gauche) alors que les bandes correspondant à la forme immature partiellement glycosylée (55 kDa) semblent plus intenses chez les patients mucoviscidosiques que chez les contrôles (Fig.3A, panneau en bas à gauche). Concernant le  $\beta_2$ -AR, une bande est retrouvée chez tous les individus contrôles alors que chez les personnes atteintes de mucoviscidose, la bande correspondant au  $\beta_2$ -AR n'est observée que chez un seul patient sur quatre et l'intensité de cette bande est relativement faible (Fig.3B, panneau de gauche). Il semblerait donc y avoir une forte diminution d'expression du  $\beta_2$ -AR dans les bronches mucoviscidosiques. À l'inverse, pour le  $\beta_3$ -AR, une bande est retrouvée chez tous les patients atteints de mucoviscidose avec une forte intensité pour trois d'entre eux sur quatre, alors que chez les contrôles, la bande du  $\beta_3$ -AR n'est détectée que chez trois individus sur cinq dont un avec une expression faible (Fig.3C, panneau de gauche). Dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, l'expression de ces différentes protéines semble être sensiblement la même dans les lignées contrôle ou mucoviscidosique (Fig.3A à 3C, panneaux de droite). L'équivalence des quantités de protéines chargées dans chaque puits est attestée par la détection d'une protéine de référence, la GAPDH, dont l'intensité des bandes est similaire pour chaque condition (Fig.3D).

Compte tenu des hétérogénéités d'expression entre les bronches contrôles et mucoviscidosiques, nous avons vérifié l'éventuelle significativité des différences observées en Western blot. Pour cela, l'intensité des bandes de Western blot a été analysée par le logiciel Metamorph (Universal Imaging) et normalisé par rapport à la GAPDH (Fig.4).

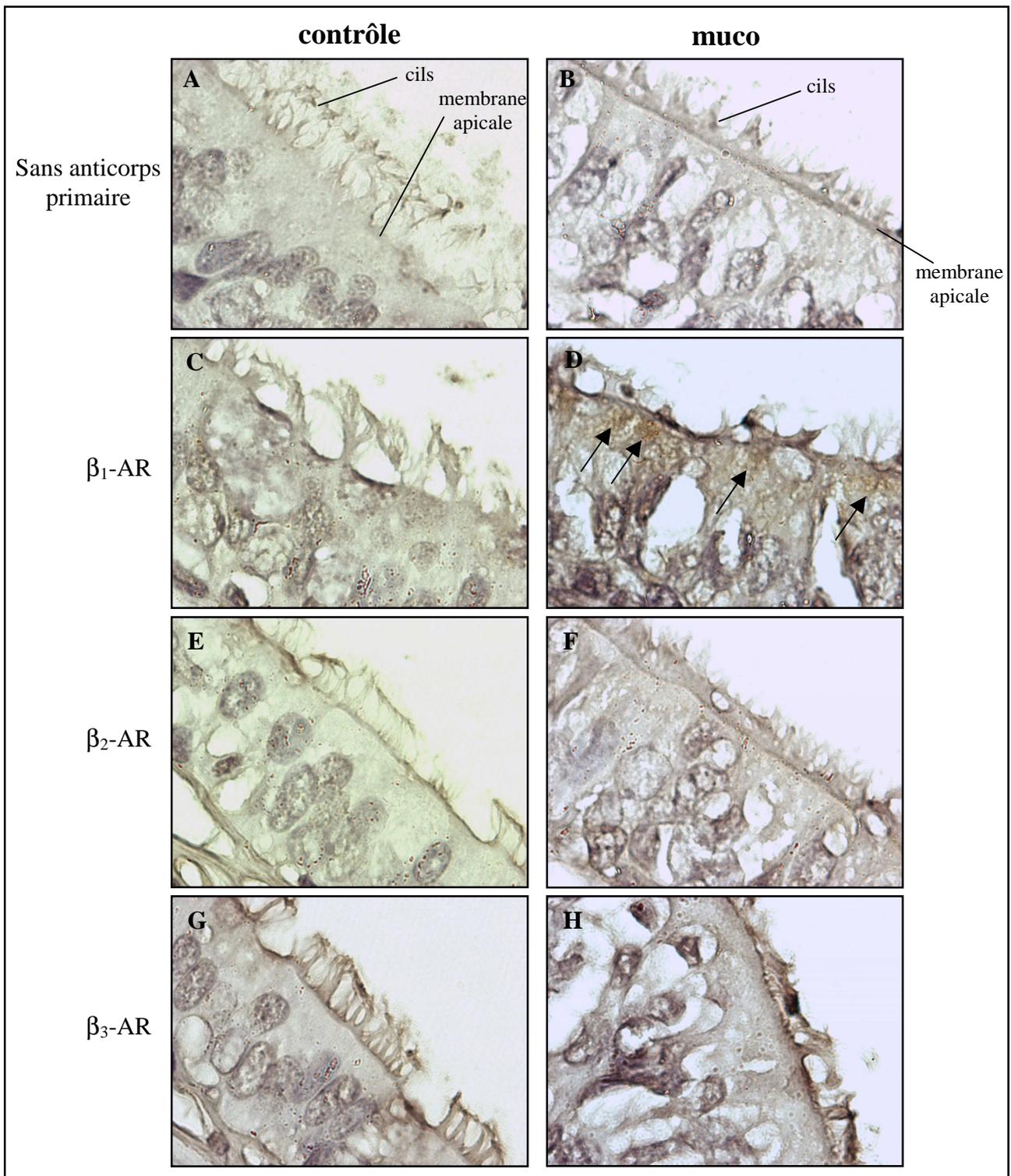


**Figure 4. Quantification chez les patients contrôles et mucoviscidosiques de l'expression protéique bronchique (A, B, C) du  $\beta_1$ -AR, (D) du  $\beta_2$ -AR et (E) du  $\beta_3$ -AR.**

\* :  $p < 0,05$

Les résultats de quantification protéique démontrent une augmentation significative de 90% de l'expression globale des  $\beta_1$ -ARs dans les bronches mucoviscidosiques ( $p = 0,011$  ; Fig.4A). Cette augmentation est due à l'augmentation d'expression de 174% de la forme immature du  $\beta_1$ -AR ( $p = 0,022$  ; Fig.4B) puisque aucune différence significative n'apparaît pour la forme mature ( $p = 0,506$  ; Fig.4C). De même, le  $\beta_3$ -AR a une expression accrue de 178% dans les bronches mucoviscidosiques ( $p = 0,024$  ; Fig.4E). Au contraire, les niveaux d'expression bronchique du  $\beta_2$ -AR et de NHE-RF1 sont fortement diminués dans la mucoviscidose, avec une baisse de 71% et 43% respectivement ( $p = 0,038$  et  $p = 0,023$  ; Fig.4D et 4F respectivement). Les niveaux d'expression de la GAPDH entre les deux groupes ont également été comparés et n'ont pas montré de différence significative (résultat non présenté).

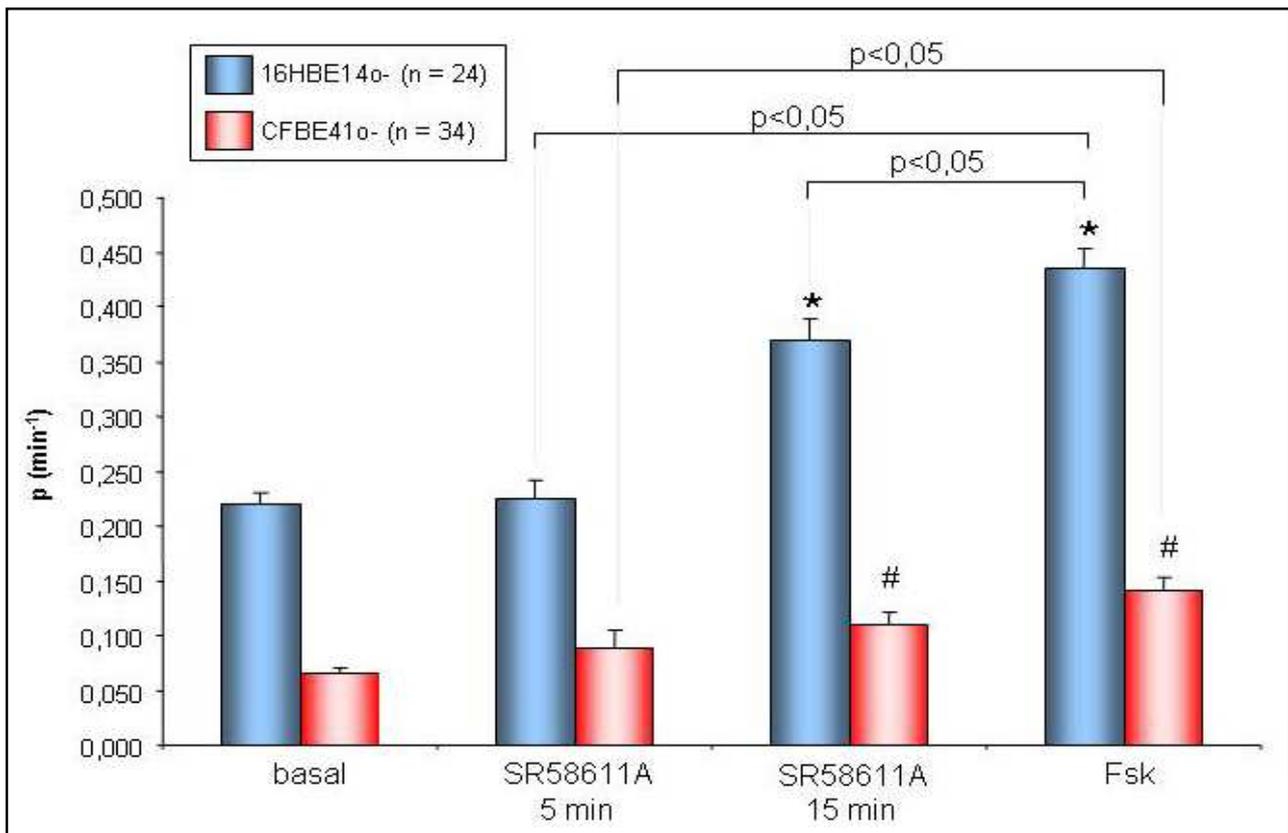
Nous avons alors réalisé des immunomarquages sur des lames de tissus bronchiques humains afin de déterminer la localisation des  $\beta$ -ARs. La figure 5 présente une série d'immunomarquages effectués sur un individu contrôle et un individu mucoviscidose.



**Figure 5.** Immunomarquage HRP (en marron) de coupes bronchiques humaines contrôle (A, C, E, G) et mucoviscidose (B, D, F, H). Les lames ont été incubées : (A, B) sans anticorps primaire ou avec un anticorps primaire dirigé contre (C, D) le  $\beta_1$ -AR, (E, F) le  $\beta_2$ -AR ou (G, H) le  $\beta_3$ -AR. Les flèches indiquent un marquage cytosolique du  $\beta_1$ -AR.

Tout d'abord, en considérant simplement l'aspect de l'épithélium bronchique de surface, celui-ci est très endommagé chez les patients mucoviscidosiques par rapport aux contrôles. Par ailleurs, comme le suggéraient les résultats de Western blots dans les lignées épithéliales bronchiques humaines, les immunomarquages effectués sur des bronches contrôles confirment une expression des trois sous-types de  $\beta$ -ARs dans les cellules épithéliales bronchiques ciliées, et plus précisément au niveau de la membrane apicale de ces cellules (Fig.5C, 5E, 5G). La comparaison avec les immunomarquages de bronche mucoviscidosique a révélé quelques divergences. Ainsi, la protéine  $\beta_1$ -AR présente un marquage global plus intense dans les bronches mucoviscidosiques (Fig.5D), toujours localisé au niveau de la membrane apicale mais également au niveau cytosolique subapical (Fig.5D, flèches). En revanche, l'immunomarquage  $\beta_2$ -adrénergique disparaît dans les cellules épithéliales des bronches mucoviscidosiques (Fig.5F), corroborant les résultats obtenus en Western blot. Cependant, sur quatre patients mucoviscidosiques étudiés, une seule coupe de bronche a montré une immunoréactivité  $\beta_2$ -adrénergique (résultat non montré). Le  $\beta_3$ -AR montre quant à lui un marquage épithélial apical généralement plus intense dans les bronches mucoviscidosiques (Fig.5H), avec parfois un marquage subapical de l'épithélium bronchique. La présence du  $\beta_3$ -AR était parfois difficilement détectable dans les bronches d'individus contrôles.

Notre étude étant la première à démontrer l'expression du  $\beta_3$ -AR dans les poumons humains, nous avons voulu étudier sa pertinence physiologique en mesurant l'effet de la stimulation  $\beta_3$ -adrénergique sur l'activité chlorure de CFTR dans nos lignées épithéliales bronchiques humaines contrôle et mucoviscidosique (Fig.6).



**Figure 6. Activité chlorure de CFTR mesurée par microcytofluorimétrie sur les cellules épithéliales bronchiques humaines saines 16HBE14o- et mucoviscidosiques CFBE41o-.**

Fsk = forskoline

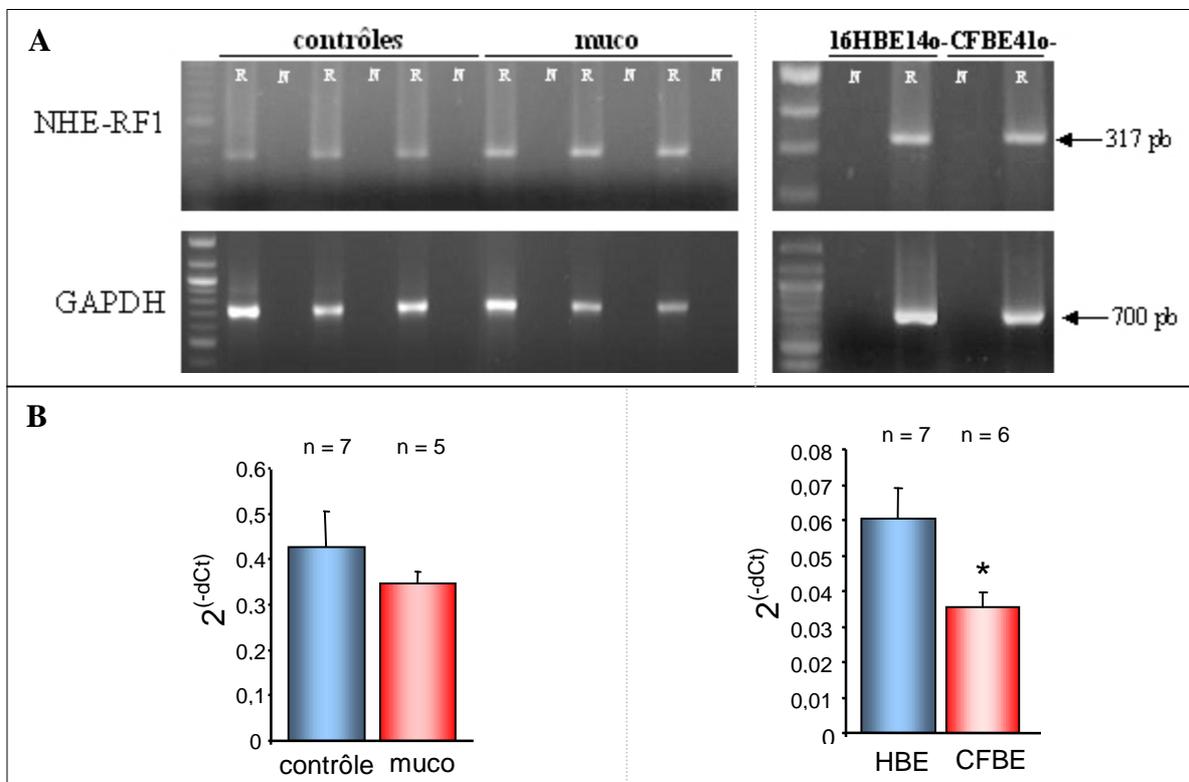
\* : p < 0,05 vs. activité basale des cellules 16HBE14o-.

# : p < 0,05 vs. activité basale des cellules CFBE41o-.

Au niveau basal, CFTR présente une activité chlorure dans les cellules 16HBE14o-, alors que dans la lignée homozygote pour  $\Delta F508$ , l'activité chlorure de base est faible, correspondant à de faibles quantités de mutants  $\Delta F508$  atteignant naturellement la membrane (Fig.6). La stimulation du  $\beta_3$ -AR par un agoniste spécifique, le SR58611A, conduit à une augmentation significative de l'activité de CFTR après 15 minutes d'exposition mais pas à 5 minutes, dans les deux lignées (Fig.6). Cela signifie que le  $\beta_3$ -AR est capable de stimuler l'activité de CFTR sauvage, mais également du peu de protéines mutantes  $\Delta F508$  présentes à la surface cellulaire. Cependant, l'activité chlorure de CFTR est encore augmentée par la forskoline (Fsk) qui recrute presque instantanément la voie adénylate cyclase – AMPc – PKA (Fig.6). Au contraire, la voie de signalisation  $\beta_3$ -adrénergique est lente à se mettre en place puisqu'elle n'est toujours pas effective après 5 minutes d'exposition à l'agoniste (Fig.6). La différence de cinétiques entre l'activation de CFTR par le  $\beta_3$ -AR et par la Fsk suggère que la

voie recrutée par le  $\beta_3$ -AR soit différente de la voie de l'adénylate cyclase. Cette voie pourrait être celle déjà décrite par notre équipe dans des cellules transfectées avec *CFTR* et le  $\beta_3$ -AR et recrutant les protéines  $G_{i/o}$  – PI3K – MAPK (Robay *et al.*, 2005).

La protéine NHE-RF1 étant impliquée dans l'adressage et la fonction de CFTR, nous avons voulu caractériser son niveau d'expression et sa localisation dans les bronches humaines contrôles en comparaison avec les bronches de patients atteints de mucoviscidose. La figure 7 regroupe les expériences visant à détecter et quantifier les ARNm de NHE-RF1 dans les tissus et dans nos lignées cellulaires humaines.



**Figure 7.** Caractérisation des transcrits de NHE-RF1 dans les bronches humaines contrôles et mucoviscidosiques ainsi que dans les lignées épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o-. (A) PCR réalisée avec des amorces spécifiques de l'ADNc de NHE-RF1 (panneaux du haut) et de la GAPDH (panneaux du bas). (B) PCR quantitative en temps réel sur les bronches humaines (graphe de gauche) et les lignées cellulaires (graphe de droite).

R : échantillon reverse-transcrit.

N : échantillon non reverse-transcrit.

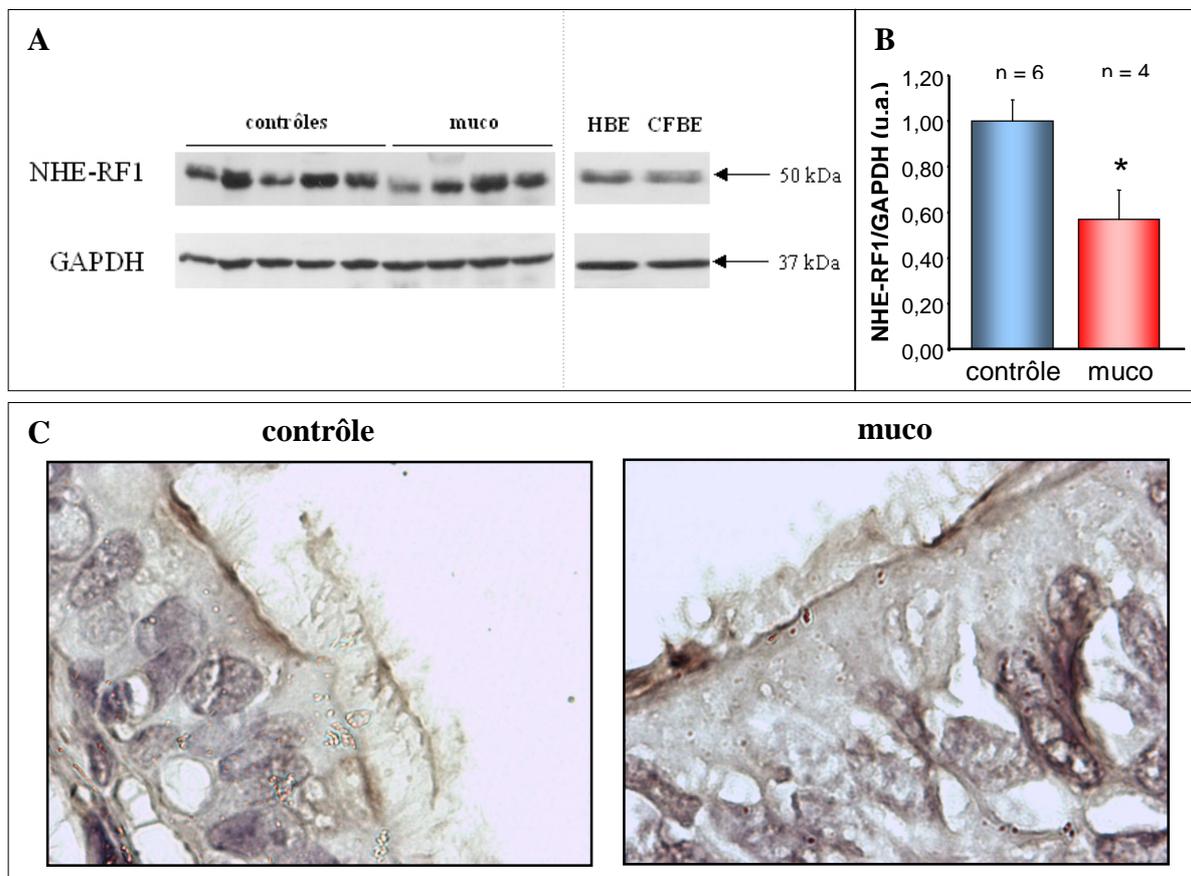
HBE : lignée épithéliale bronchique humaine saine 16HBE14o-.

CFBE : lignée épithéliale bronchique humaine homzygote pour  $\Delta F508$  CFBE41o-.

\* : p < 0,05

Les ARNm de NHE-RF1 sont détectés dans les tissus et les lignées cellulaires aussi bien dans les conditions contrôles que mucoviscidiques (Fig.7A). Les expériences de PCR quantitatives ont révélé une diminution des ARNm de NHE-RF1 dans les conditions mucoviscidiques. Cette diminution n'est pas significative pour les tissus bronchiques humains ( $p = 0,42$  ; Fig.7B graphe de gauche) alors qu'elle l'est pour les lignées épithéliales bronchiques humaines ( $p = 0,028$  ; Fig.7B graphe de droite).

Nous avons ensuite caractérisé la présence protéique de NHE-RF1 dans les bronches et lignées cellulaires humaines (Fig.8).



**Figure 8.** Caractérisation protéique de NHE-RF1 dans les bronches humaines contrôles et mucoviscidiques ainsi que dans les lignées épithéliales bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o-. (A) Western blots réalisés à partir de 5 bronches humaines contrôles et 4 bronches humaines mucoviscidiques (panneaux de gauche) et à partir des lignées épithéliales bronchiques humaines (panneaux de droite). avec un anticorps primaire NHE-RF1 (en haut) et la GAPDH (en bas). (B) Quantification de l'expression bronchique de NHE-RF1. (C) Immunomarquage HRP de NHE-RF1 sur une coupe bronchique humaine contrôlée (photo de gauche) et mucoviscidique (photo de droite).

HBE : lignée épithéliale bronchique humaine saine 16HBE14o-.

CFBE : lignée épithéliale bronchique humaine homzygote pour  $\Delta F508$  CFBE41o-.

\* :  $p < 0,05$

En Western blot, une bande à 50 kDa atteste la présence de la protéine NHE-RF1 chez tous les individus, de même que dans les deux lignées bronchiques humaines (Fig.8A). L'analyse de l'intensité des bandes des différents échantillons issus des patients a révélé une diminution significative de l'expression protéique de NHE-RF1 dans les bronches mucoviscidiques ( $p = 0,023$  ; Fig.8B). Les immunomarquages sur coupes bronchiques ont montré une localisation membranaire apicale de NHE-RF1 dans les bronches contrôles et mucoviscidiques (Fig.8C) même si dans ces dernières, le marquage était généralement moins prononcé voire presque indétectable chez certains patients.

### 3- Discussion

Ces travaux sont les premiers à démontrer la présence du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique dans les poumons humains. Cette conclusion découle de la corroboration de plusieurs résultats. Nous avons d'abord détecté dans les bronches humaines la présence de l'ARNm du  $\beta_3$ -AR par PCR, la présence de la protéine  $\beta_3$ -AR par Western Blot et par immunomarquage, et nous avons caractérisé sa présence fonctionnelle en mettant en évidence sa capacité à réguler de façon native l'activité de CFTR dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines.

Par ailleurs, nous montrons une localisation apicale des trois sous-types de  $\beta$ -ARs au niveau de l'épithélium bronchique. Cette localisation apicale pose la question de leur accessibilité et de leur régulation physiologique par les catécholamines naturelles (adrénaline, noradrénaline). Une activité constitutive d'une partie des  $\beta$ -ARs localisés à la membrane apicale de l'épithélium bronchique est concevable. Une telle activité a déjà été décrite *in vitro* et dépendrait en partie de l'isoforme de protéine G qui est associée au récepteur (Seifert *et al.*, 1998 ; Ambrosio *et al.*, 2000 ; Hopkinson *et al.*, 2000 ; Engelhardt *et al.*, 2001). Paradoxalement, chez un groupe de patients ayant subi une résection pulmonaire, une étude a constaté que plus le taux de catécholamines circulantes est élevé, plus le niveau d'expression globale des  $\beta$ -ARs dans les poumons est faible (Liggett *et al.*, 1988). Or, dans la mucoviscidose, une diminution de l'expression globale des  $\beta$ -ARs pulmonaires a déjà été décrite (Sharma & Jeffery, 1990), ainsi qu'une augmentation des taux de catécholamines circulantes (Schöni *et al.*, 1985). Une relation semble donc exister entre les catécholamines du sang et les  $\beta$ -ARs extra-vasculaires des poumons.

Nos travaux confirment cette variation d'expression des  $\beta$ -ARs mais révèlent aussi celle de NHE-RF1 dans la mucoviscidose. NHE-RF1 et le  $\beta_2$ -AR sont sous-exprimés dans la pathologie alors que les  $\beta_1$  et  $\beta_3$ -AR sont sur-exprimés. La sur-expression protéique du  $\beta_1$ -AR est intrigante puisque les taux d'ARNm  $\beta_1$ -AR sont fortement réduits dans la pathologie. Il y aurait donc une régulation différentielle de l'ARNm et de la protéine  $\beta_1$ -AR. Dans les bronches mucoviscidosiques, les ARNm  $\beta_1$ -AR pourraient être moins nombreux mais plus stables, expliquant ainsi l'augmentation protéique observée. Il semble peu probable que cette augmentation protéique soit due à une meilleure stabilité de la protéine à la membrane puisque nous n'observons pas de modification de la forme mature. L'abondance de la forme immature correspondrait plutôt à une augmentation de la synthèse protéique du  $\beta_1$ -AR, même si les ARNm sont moins nombreux. Les expériences d'immunomarquage montrent l'existence d'un pool cytosolique de  $\beta_1$ -ARs dans les bronches mucoviscidosiques, en plus du pool membranaire, pouvant indiquer une accumulation de protéine en cours d'adressage suite à une forte synthèse protéique.

Dans la mucoviscidose, les taux plasmatiques en catécholamines étant plus élevés que chez les personnes saines (Schöni *et al.*, 1985), la diminution d'expression du  $\beta_2$ -AR peut s'expliquer par le processus de désensibilisation. Mais une diminution de la transcription pourrait également en être à l'origine, même si la quantification des ARNm n'a pas atteint la significativité ( $p = 0,055$ ) à cause d'une forte hétérogénéité entre les patients et un faible nombre de prélèvements obtenus. Cependant, les lignées cellulaires n'ont pas confirmé cette forte tendance de diminution des ARNm  $\beta_2$ -AR. Il faut noter que les cellules en culture ne sont exposées ni aux catécholamines endogènes, ni aux phénomènes inflammatoires, ni au stress oxydatif qui sont rencontrés *in vivo* dans les bronches. Il est donc possible que cette baisse d'expression du  $\beta_2$ -AR dans les bronches mucoviscidosiques soit due à ces facteurs extrinsèques aux cellules, notamment aux catécholamines dont les taux sont plus élevés dans la pathologie. Cela expliquerait l'absence de marquage bronchique du  $\beta_2$ -AR observée en immunohistologie chez les patients atteints de mucoviscidose. Mais, alors que les  $\beta_2$ -ARs seraient internalisés et dégradés, les  $\beta_1$ -ARs semblent être résistants à cette désensibilisation.

De même, la surexpression du  $\beta_3$ -AR pourrait être due à une augmentation de la transcription par activation des séquences promotrices CRE (cAMP responsive element) du gène du  $\beta_3$ -AR (Liggett & Schwinn, 1991). Cet effet positif d'une exposition chronique à un

agoniste sur l'expression du  $\beta_3$ -AR a déjà été décrit chez la souris (Thomas *et al.*, 1992). Mais les expériences de PCR quantitative ne permettent pas de valider cette hypothèse puisque aucune différence significative n'est observée dans nos tissus pour le  $\beta_3$ -AR, même si une forte tendance à l'augmentation apparaît. Cependant, une augmentation significative des taux d'ARNm du  $\beta_3$ -AR est détectée dans les cellules CFBE41o-, en comparaison à la lignée saine 16HBE14o- alors que ces lignées ne sont pas soumises aux mêmes conditions environnementales que dans les bronches. L'augmentation d'expression du  $\beta_3$ -AR observée semblerait donc être une conséquence de l'absence physique et/ou fonctionnelle de CFTR à la membrane apicale. Mais, elle pourrait également être consécutive de la chute d'expression du  $\beta_2$ -AR.

L'origine de la diminution d'expression bronchique de NHE-RF1 dans la mucoviscidose est également ambiguë. Alors que les taux d'ARNm NHE-RF1 ne varient pas significativement dans les tissus contrôles et mucoviscidosiques, ils diminuent dans la lignée CFBE41o- en comparaison avec la lignée saine 16HBE14o-. Cela suppose qu'en dehors de toute influence extrinsèque comme celles rencontrées *in vivo*, l'absence de CFTR dans la lignée CFBE41o- conduirait à un rétrocontrôle négatif agissant sur la transcription de l'ARNm NHE-RF1 ou sa stabilité. Par ailleurs, CFTR, NHE-RF1 et le  $\beta_2$ -AR sont capables de s'associer dans un même complexe (Naren *et al.*, 2003). Curieusement, dans la mucoviscidose où CFTR est absent physiquement et/ou fonctionnellement, nous montrons une diminution d'expression des autres partenaires majeurs de ce complexe multiprotéique, NHE-RF1 et le  $\beta_2$ -AR, alors que l'expression des autres sous-types de  $\beta$ -ARs,  $\beta_1$  et  $\beta_3$ -AR, est augmentée. Nos résultats conduisent à émettre l'hypothèse que dans la mucoviscidose, l'expression de NHE-RF1 et du  $\beta_2$ -AR, qui sont les partenaires apicaux associés à CFTR, serait diminuée car la mise en place de tels complexes multiprotéiques est rendue impossible par l'absence de CFTR. Ainsi, NHE-RF1 et le  $\beta_2$ -AR pourraient être dégradés faute d'être stabilisés au sein d'un complexe. Mais, alors que le  $\beta_2$ -AR n'est plus détectable par immunomarquage dans les bronches de patients mucoviscidosiques, NHE-RF1 conserve sa localisation apicale au niveau de l'épithélium bronchique chez la plupart de ces patients, suggérant qu'il interagisse encore avec d'autres partenaires protéiques.

La signification physiologique du remodelage observé dans les bronches mucoviscidosiques reste à déterminer. Cependant, ces variations d'expression doivent être prises en compte dans l'éventualité d'administrer des agonistes  $\beta$ -adrénergiques pour stimuler

la fréquence des battements ciliaires ou améliorer les transports électrolytiques. Même si le remodelage est variable d'un patient à l'autre, d'une manière générale les  $\beta_2$ -ARs sont absents de l'épithélium bronchique des patients mucoviscidosiques, alors que les  $\beta_1$ -ARs et  $\beta_3$ -ARs voient leur expression augmentée et semblent être les seuls  $\beta$ -ARs pharmacologiquement accessibles au niveau bronchique dans la mucoviscidose. Par ailleurs, NHE-RF1 étant primordial dans l'adressage et la fonction de CFTR, sa diminution d'expression bronchique dans la mucoviscidose doit également être considérée pour une éventuelle restauration pharmacologique de l'adressage et/ou de la fonction des mutants de CFTR chez les patients.

## **DISCUSSION - PERSPECTIVES**

Mes travaux de thèse nous ont permis de mettre en évidence :

- une interaction entre NHE-RF1 et le mutant  $\Delta F508$ , permettant de restaurer la localisation et la fonction de  $\Delta F508$  ;
- une modification d'expression de NHE-RF1 dans les bronches de patients mucoviscidosiques ;
- l'expression endogène du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique dans les poumons humains, plus particulièrement au niveau de l'épithélium bronchique ;
- une modification d'expression des trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans les bronches mucoviscidosiques.

L'expression polarisée des protéines membranaires est un phénomène essentiel pour l'homéostasie cellulaire, notamment pour la coordination des échanges ioniques. Les protéines à domaines PDZ sont des facteurs primordiaux de la distribution polarisée des protéines membranaires. NHE-RF1 est une protéine possédant deux domaines PDZ et intervient dans l'expression et la stabilité apicales de CFTR. Dans nos travaux, nous avons utilisé les cellules humaines A549 et canines MDCK qui expriment NHE-RF1 de façon endogène. Cependant, cette expression native de NHE-RF1 est sans effet sur l'activité et la localisation de la protéine humaine mutée  $\Delta F508$  exprimée après transfection de ces cellules. Par contre, la co-transfection de ces cellules par NHE-RF1 et  $\Delta F508$  permet d'augmenter la conductance chlorure, et pour les cellules polarisées MDCK, d'observer une localisation membranaire apicale de  $\Delta F508$ . Ce résultat démontre l'implication de NHE-RF1 dans l'adressage apical du mutant. Cependant, l'intensité de l'activité chlorure observée dans ces conditions est moindre que pour la protéine CFTR sauvage seule ou en présence de NHE-RF1. La quantification du taux de protéine CFTR apical ne révèle pourtant aucune différence significative entre les conditions {CFTR}, {CFTR + NHE-RF1} et { $\Delta F508$  + NHE-RF1}. La différence d'activité chlorure observée dans la condition { $\Delta F508$  + NHE-RF1} provient donc du défaut de conductance intrinsèque du mutant  $\Delta F508$ .

Par ailleurs, la surexpression de NHE-RF1 n'induit pas d'augmentation de l'expression apicale de CFTR sauvage alors qu'elle améliore son activité chlorure (basale et stimulée par la Fsk pour les cellules A549, stimulée par la Fsk pour les cellules MDCK). Ceci démontre l'implication directe de NHE-RF1 dans la régulation de la fonction du canal CFTR.

Nos travaux confirment donc le double rôle de NHE-RF1 à la fois sur l'adressage et sur l'activité chlorure de CFTR.

En outre, la restauration de la localisation apicale de  $\Delta F508$  en présence de NHE-RF1 n'est pas due à une augmentation généralisée de l'adressage des protéines membranaires de la cellule. En effet, un mutant d'adressage du canal potassique KCNQ1 n'est pas affecté par la surexpression de NHE-RF1, contrairement à  $\Delta F508$ . Cependant, KCNQ1 n'entretient pas d'interaction avec les domaines PDZ de NHE-RF1. Par conséquent, un effet de la surexpression de NHE-RF1 sur d'autres partenaires protéiques avec lesquels il entretient des interactions PDZ reste envisageable.

Notre étude démontre que NHE-RF1 permet de corriger les défauts de dégradation précoce, de maturation et d'adressage du mutant  $\Delta F508$  afin de l'acheminer à la membrane plasmique apicale où il est fonctionnel. NHE-RF1 était décrit jusque là pour intervenir au niveau de la stabilité apicale et le recyclage endocytaire entre la membrane et les compartiments post-golgiens. Or, nos travaux suggèrent que NHE-RF1 puisse également intervenir plus précocement, au niveau du RE, pour empêcher la dégradation précoce de  $\Delta F508$  et favoriser sa maturation complète jusqu'à la membrane plasmique. Les mécanismes impliqués dans ces effets restent à démontrer. Néanmoins, plusieurs hypothèses peuvent être proposées :

- NHE-RF1 pourrait interagir au niveau du RE avec certaines protéines chaperonnes ou leurs co-chaperonnes et empêcher la dégradation de  $\Delta F508$  suite à une rétention prolongée ;
- NHE-RF1 pourrait altérer l'activité de certaines protéines du protéasome. Le protéasome n'étant plus opérationnel, les protéines  $\Delta F508$  seraient adressées à la membrane apicale (Vij *et al.*, 2006) ;
- NHE-RF1 pourrait ne pas intervenir au niveau du RE mais au niveau post-golgien où il stabiliserait le faible pourcentage de protéines  $\Delta F508$  atteignant naturellement la surface cellulaire. La demi-vie de ces mutants serait alors significativement augmentée, expliquant qu'ils s'accumulent au point d'être détectables par immunomarquage.

En conclusion, le mutant le plus fréquemment rencontré chez les patients mucoviscidosiques voit sa localisation et sa fonction réhabilitées par surexpression de NHE-

RF1 *in vitro*. La validation *in vivo* de cet effet bénéfique de NHE-RF1 est en projet dans notre équipe. En effet, nous envisageons d'utiliser un modèle murin homozygote pour la mutation  $\Delta F508$  dans lequel nous transfecterons le plasmide NHE-RF1 au niveau de l'épithélium bronchique. Une collaboration avec le Dr Bruno Pitard permettra de réaliser cette transfection par aérosol ou par instillation intra-trachéale (Desigaux *et al.*, 2005). Les effets de la transfection de NHE-RF1 seront investigués au niveau de l'épithélium bronchique murin à différents temps après la transfection (24h, 48h, 7 jours et 28 jours) par immunomarquage de  $\Delta F508$ . Des études fonctionnelles du mutant  $\Delta F508$  pourront également être menées après mise en culture primaire des cellules épithéliales bronchiques de souris transfectées avec NHE-RF1. Dans la seconde partie de mes travaux de thèse, nous avons mis en évidence une diminution significative de l'expression de NHE-RF1 dans les bronches humaines de patients mucoviscidosiques par rapport aux patients contrôles. Le remodelage des transcrits de NHE-RF1 a été confirmé dans la lignée épithéliale bronchique humaine homozygote pour  $\Delta F508$  CFBE41o- en comparaison avec la lignée contrôle 16HBE14o- et des travaux sont en cours pour étudier les niveaux d'expression protéique de NHE-RF1 dans ces deux lignées cellulaires ainsi que dans des cellules épithéliales bronchiques isolées à partir des prélèvements de patients. Ce remodelage pourra également être investigué dans le modèle murin homozygote pour  $\Delta F508$  en comparaison à la souche de souris saine correspondante. Différentes quantités de plasmide NHE-RF1 pourront aussi être testées en transfection afin de déterminer la dose optimale ainsi que la dose minimale conduisant à un effet significatif sur la localisation et/ou la fonction de  $\Delta F508$  murin endogène.

Par ailleurs, l'identification de composés pharmacologiques capables d'augmenter l'expression de NHE-RF1 ou de stimuler l'interaction NHE-RF1/CFTR aurait un intérêt thérapeutique potentiel pour les patients. Cependant, même si nous n'avons pas observé d'effet néfaste lors de la surexpression de NHE-RF1 dans nos cellules, il faudrait s'assurer que cette surexpression n'induit pas de modification d'expression apicale des autres protéines avec lesquelles NHE-RF1 interagit physiologiquement, comme le  $\beta_2$ -AR ou l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

L'expression de NHE-RF1 étant modifiée dans la mucoviscidose, il serait intéressant d'évaluer les modifications éventuelles d'expression de CAL dans la pathologie. En effet, il a été suggéré que NHE-RF1 et CAL entrent en compétition pour la liaison à CFTR par leurs domaines PDZ dans les compartiments post-golgiens (Cheng *et al.*, 2002). CAL ayant une action inhibitrice sur l'expression apicale de CFTR, une augmentation de son expression dans

la mucoviscidose aurait un effet négatif additif à la sous-expression de NHERF1 observée. En revanche, une diminution d'expression de CAL compenserait l'effet négatif de la sous-expression de NHE-RF1 dans les bronches mucoviscidosiques. Cela a été démontré dans la lignée CFBE41o- par l'utilisation de siRNA spécifique de CAL (Wolde *et al.*, 2007). Cela signifie que la stabilisation des mutants  $\Delta F508$  parvenant à passer l'appareil de Golgi est suffisante pour restaurer leur fonction et leur localisation. Cette stabilisation peut être obtenue indifféremment par sur-expression de NHE-RF1 ou par sous-expression de CAL. De plus, une étude récente menée sur cellules CFBE41o- natives, montre que la protéine NHE-RF1 endogène n'interagit avec le mutant  $\Delta F508$  que lorsque ce dernier est restauré par abaissement de la température (Kwon *et al.*, 2007), ce qui implique une interaction entre le mutant et NHE-RF1 uniquement dans les compartiments post-RE. Par conséquent, la restauration membranaire fonctionnelle de  $\Delta F508$  par sur-expression de NHE-RF1 serait due à une stabilisation des mutants parvenant à passer outre le contrôle qualité du RE. Cela invalide l'hypothèse d'une facilitation de la maturation de  $\Delta F508$  par interaction de NHE-RF1 avec des chaperonnes ou des protéines du protéasome.

Dans notre étude, nous avons montré la restauration du mutant  $\Delta F508$  transfecté par sur-expression de NHE-RF1. Or, la transfection de  $\Delta F508$  pourrait entraîner une sur-expression qui faciliterait le phénomène d'échappement que nous observons. Cependant, une autre équipe a obtenu des résultats similaires par sur-expression de la protéine NHE-RF1 murine dans la lignée CFBE41o- exprimant le mutant  $\Delta F508$  de façon native (Guerra *et al.*, 2005). De même, les études récentes menées sur les cellules épithéliales humaines CFBE41o- ont mis en évidence la possibilité des restaurer la protéine  $\Delta F508$  endogène par inhibition de CAL (Wolde *et al.*, 2007). Ces résultats confortent notre projet de valider *in vivo* les effets de la sur-expression de NHE-RF1 chez des souris exprimant de façon native et homozygote la mutation  $\Delta F508$ .

L'épithélium respiratoire est recouvert d'une couche de mucus qui représente une barrière de défense pour l'organisme. Les poussières inhalées et les agents infectieux sont piégés dans ce mucus et sont ensuite éliminés vers les voies aériennes supérieures grâce au mouvement des cils vibratiles. Dans la mucoviscidose, l'absence fonctionnelle de CFTR entraîne une diminution de la sécrétion d'ions chlorures ainsi qu'une hyperabsorption des ions sodiques et de l'eau au niveau de l'épithélium respiratoire de surface. Du fait du défaut

d'hydratation de la surface épithéliale, le mucus est anormalement visqueux, ce qui ralentit son élimination et favorise la colonisation bactérienne et l'inflammation.

Les agonistes  $\beta$ -adrénergiques exercent différents effets sur l'épithélium respiratoire. Ils augmentent la fréquence des battements ciliaires. Cet effet est probablement le principal mécanisme par lequel les agonistes  $\beta$ -adrénergiques augmentent la clairance muco-ciliaire. Ils stimulent également les transports électrolytiques et par conséquent les flux d'eau, ce qui contribuerait à fluidifier le mucus et faciliter son transport. Il est admis que le  $\beta_2$ -AR est le sous-type prédominant dans les poumons avec environ 80% des  $\beta$ -ARs totaux, alors que le  $\beta_1$ -AR représente environ 20%.

Or, mes travaux de thèse démontrent la présence du troisième sous-type de récepteur  $\beta$ -adrénergique, le  $\beta_3$ -AR, dans les cellules épithéliales bronchiques humaines. Le rôle physiologique du  $\beta_3$ -AR dans l'épithélium bronchique reste à définir. Cependant, nous démontrons qu'il régule positivement l'activité chlorure de CFTR dans une lignée de cellules épithéliales bronchiques, comme les  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -AR, suggérant qu'il soit capable d'entraîner un efflux d'eau pour améliorer l'hydratation du mucus au niveau de la surface de l'épithélium. Ces résultats peuvent avoir de fortes implications physiologiques et physiopathologiques dans la mucoviscidose mais aussi dans d'autres affections où la sécrétion électrolytique est altérée. Cependant, la voie d'activation de CFTR par le  $\beta_3$ -AR que notre équipe a déterminé comme étant la voie  $G_{i/o}$  – PI3K – MAPK dans des cellules transfectées par les gènes d'intérêt (Robay *et al.*, 2005), doit être vérifiée dans des cellules natives. Aucune phosphorylation de CFTR par la PI3K ou par les MAPK n'a été décrite. Mais la PI3K et les MAPK sont des sérine/thréonine kinases. CFTR possédant un grand nombre de sérines et thréonines phosphorylables dans son domaine R, une régulation par ces kinases est très plausible. L'utilisation d'agonistes  $\beta_3$ -adrénergiques est envisageable dans le but de stimuler CFTR au niveau de l'épithélium bronchique et entraîner un transport d'eau pour fluidifier le mucus et faciliter l'expectoration. Les agonistes du  $\beta_3$ -AR ont l'avantage de ne pas conduire à une désensibilisation du récepteur en cas de traitement prolongé, ce qui n'est pas le cas pour les  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -ARs. Les effets d'agonistes  $\beta_3$ -adrénergiques sur les battements ciliaires restent à déterminer chez l'homme, bien qu'ils sont décrits chez l'animal pour stimuler leur fréquence (Takeyama *et al.*, 1993 ; Tamaoki *et al.*, 1993a). Le traitement prolongé des voies aériennes avec des agonistes  $\beta_3$ -adrénergiques aurait une pertinence clinique compte tenu d'une part de

la résistance du  $\beta_3$ -AR au phénomène de désensibilisation dépendante d'un agoniste et, d'autre part, de sa possible augmentation d'expression lors de traitements chroniques (Thomas *et al.*, 1992). De plus, la localisation apicale des trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques au niveau de l'épithélium bronchique suggère une relative facilité d'accès pour des traitements par aérosol. Cependant, l'efficacité des agents pharmacologiques administrés est fortement diminuée par la présence de mucus. Ce dernier étant épaissi dans la mucoviscidose, l'accès à la surface épithéliale pourrait être d'autant plus difficile. Néanmoins, le mucus est presque statique dans la pathologie si bien que les substances actives sont moins rapidement éliminées.

Mes travaux démontrent aussi que la lignée épithéliale bronchique humaine exprimant le CFTR sauvage (16HBE14o-) ainsi que celle homozygote pour  $\Delta F508$  (CFBE41o-) expriment toutes les deux de façon endogène les trois sous-types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Compte tenu de leur capacité à se polariser, ces lignées constituent un bon modèle d'étude de l'influence des  $\beta$ -ARs sur la maturation, l'adressage et la fonction de CFTR sauvage ou  $\Delta F508$ .

Mes travaux de thèse ont également permis de mettre en évidence un remodelage de l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques au niveau bronchique dans la mucoviscidose, ainsi que d'une protéine à domaines PDZ partenaire de CFTR, NHE-RF1. En effet, d'une manière générale, les patients mucoviscidosiques voient l'expression de leurs  $\beta_1$  et  $\beta_3$ -ARs augmenter au niveau bronchique alors que celle du  $\beta_2$ -AR et de NHE-RF1 diminue. Par ailleurs, la chute d'expression simultanée de NHE-RF1 et du  $\beta_2$ -AR lorsque leur partenaire naturel, CFTR, est fonctionnellement et/ou physiquement absent de la membrane plasmique, est intrigante. Néanmoins, les causes de ce remodelage restent obscures. L'absence fonctionnelle de CFTR pourrait conduire à un rétrocontrôle négatif de ses partenaires protéiques apicaux, NHE-RF1 et le  $\beta_2$ -AR. Ces derniers ne pouvant s'associer à CFTR seraient alors dirigés vers la dégradation. Les  $\beta_1$  et  $\beta_3$ -AR voient quant à eux leur expression augmenter. Un mécanisme de compensation de la perte du  $\beta_2$ -AR peut être envisagé. Par ailleurs, les catécholamines circulantes peuvent également être suspectées comme cause du remodelage observé dans la mucoviscidose. En effet, une étude décrit une corrélation inverse entre le taux de catécholamines plasmatiques et l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques pulmonaires extravasculaires (Liggett *et al.*, 1988). De plus, une augmentation des

catécholamines circulantes est admise dans la mucoviscidose (Schöni *et al.*, 1985). Le  $\beta_2$ -AR étant le sous-type prédominant au niveau pulmonaire dans les conditions normales, sa diminution d'expression déjà décrite dans la mucoviscidose (Mak *et al.*, 2002) masquerait la surexpression des  $\beta_1$  et  $\beta_3$ -AR que nous observons. Or, l'expression des deux sous-types  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -AR peut être régulée par désensibilisation dépendante d'un agoniste. Dans la mucoviscidose, seul le  $\beta_2$ -AR est affecté par ce processus, puisque l'expression du  $\beta_1$ -AR est augmentée. Par conséquent, deux hypothèses peuvent être formulées : soit la désensibilisation dépendante d'un agoniste du  $\beta_2$ -AR au niveau de l'épithélium bronchique s'effectue par une voie intracellulaire qui lui est propre mais qui n'affecte pas le  $\beta_1$ -AR, soit la diminution d'expression du  $\beta_2$ -AR observée n'est pas due au phénomène de désensibilisation mais, par exemple, à une dégradation suite à l'impossibilité de formation du complexe CFTR/NHE-RF1/ $\beta_2$ -AR. L'étude d'éventuelles modifications d'expression de la protéine CAL aurait là encore un intérêt majeur. En effet, une expression inchangée de CAL dans les bronches mucoviscidosiques, suggérerait que l'impossibilité de former le complexe CFTR/NHE-RF1/ $\beta_2$ -AR soit responsable de la régulation négative de l'expression des partenaires apicaux de CFTR : NHE-RF1 et le  $\beta_2$ -AR. CAL ne faisant pas partie de ce complexe, son expression serait inchangée. En outre, CAL étant un motif de rétention dans les compartiments post-golgiens pour le  $\beta_1$ -AR (He *et al.*, 2004), une forte expression de CAL pourrait expliquer le pool sub-apical de  $\beta_1$ -ARs dans l'épithélium bronchique mucoviscidosique. Mais CAL se lie au  $\beta_1$ -AR mature qui a traversé l'appareil de Golgi. Une surexpression de CAL n'expliquerait donc pas l'augmentation d'expression de la forme immature du  $\beta_1$ -AR.

La figure suivante représente le remodelage bronchique que nous observons entre les patients contrôles et mucoviscidosiques.

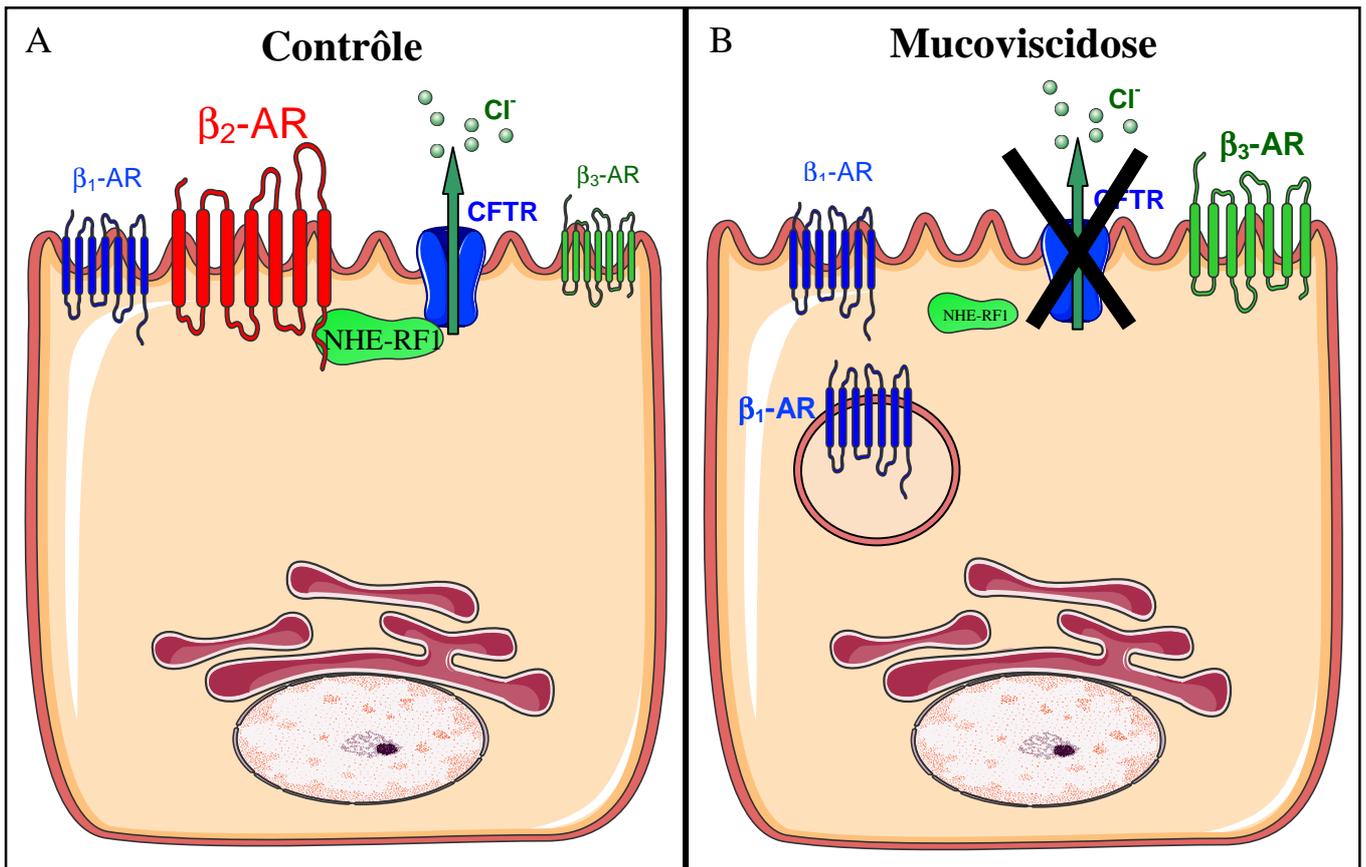


Schéma représentatif de l'expression différentielle de NHE-RF1 et des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques entre une cellule épithéliale bronchique humaine contrôlée (A) et mucoviscidieuse (B).

Les résultats obtenus en PCR quantitative divergent quelque peu entre les tissus et les lignées cellulaires, avec en particulier un manque de significativité avec les tissus (sauf pour  $\beta_1$ -AR). Ces discordances entre cellules et tissus peuvent avoir plusieurs explications. D'abord, de fortes variations au sein d'un même groupe sont dues à la diversité des individus, alors que chaque lignée cellulaire est issue d'un seul patient. Ensuite, le tissu bronchique est hétérogène. Il est constitué de différents types cellulaires auxquels s'ajoutent les cellules inflammatoires qui sont très abondantes dans les bronches mucoviscidosiques. Cela contribue à diluer le signal provenant des cellules épithéliales, alors que les lignées cellulaires sont constituées d'un seul type cellulaire. Mais, il est aussi probable que dans les bronches, des cellules non épithéliales synthétisent des ARNm  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ -AR et/ou NHE-RF1 et dans le cadre de la mucoviscidose, ces cellules pourraient également participer au remodelage que nous observons, ou au contraire pourraient le compenser par un remodelage opposé. Enfin, contrairement aux cellules bronchiques *in vivo*, nos lignées cellulaires en culture sont

soustraites de leur environnement naturel d'origine qui comporte notamment une matrice extracellulaire, des interactions physico-chimiques avec différents types cellulaires, des catécholamines et autres hormones circulantes, avec plus particulièrement dans la mucoviscidose, l'environnement bactérien, le contexte inflammatoire et le stress oxydatif. L'expression des gènes et donc des protéines de la cellule est influencée par cet environnement dynamique.

Pour affiner nos résultats, nous allons étudier les niveaux d'expression des transcrits et des protéines  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ -AR sur les cellules épithéliales bronchiques humaines isolées à partir des prélèvements contrôles et mucoviscidosiques que nous recevons. Avec ces populations cellulaires fortement enrichies en cellules épithéliales, nous nous affranchissons en grande partie de l'hétérogénéité du tissu bronchique. Par contre, nous ne pouvons éviter les fortes variabilités inter-individuelles.

D'autres expériences sont en cours dans notre équipe afin de déterminer si le remodelage protéique des  $\beta$ -ARs est retrouvé dans les deux lignées épithéliales bronchiques humaines saine (16HBE14o-) et mucoviscidosique (CFBE41o-). Ces travaux permettront de mieux comprendre l'influence de l'environnement extracellulaire sur les variations d'expression que nous observons *in vivo* chez l'Homme. Ils seront comparés aux résultats obtenus avec les cellules bronchiques humaines isolées de patients. Aussi, afin de déterminer plus particulièrement l'influence de l'environnement catécholaminergique sur le remodelage  $\beta$ -adrénergique, notre équipe initie une étude portant sur l'analyse des variations d'expression des  $\beta$ -ARs dans les lignées bronchiques humaines 16HBE14o- et CFBE41o- traitées de manière chronique avec un agoniste  $\beta$ -adrénergique non sélectif ou spécifique d'un sous-type donné. Ces résultats seront également comparés à ceux obtenus avec les cellules isolées de patients. Par ailleurs, les glucocorticoïdes étant d'une part couramment prescrits comme anti-inflammatoires dans la mucoviscidose et d'autres pathologies, et d'autre part étant reconnus comme modulateurs de l'expression des gènes des  $\beta$ -ARs, nous analyserons leur influence sur l'expression de NHE-RF1 et des  $\beta$ -ARs sur nos lignées cellulaires.

Les résultats obtenus par comparaison des bronches humaines saines et mucoviscidosiques sont à considérer en tenant compte du fait que les deux groupes ne sont pas similaires quant aux critères d'âge et de sexe. En effet, les patients atteints de mucoviscidose et subissant une transplantation sont jeunes et peuvent être des deux sexes,

alors que les patients dits contrôles ont subi une résection pulmonaire, généralement pour cause de cancer et ce sont principalement des hommes d'un certain âge. Cependant, nos prélèvements sont effectués en dehors de la zone tumorale. Par ailleurs, ces patients contrôles sont généralement fumeurs ce qui pourrait également entraîner une modification d'expression de NHE-RF1 et des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques bronchiques par rapport à des individus sains non-fumeurs. Notre étude ne tient pas compte non plus, des éventuels traitements médicaux des individus, notamment par des  $\beta$ -bloquants qui pourraient influencer l'expression des  $\beta$ -ARs. Malgré cela, pour des raisons éthiques évidentes, il est difficilement envisageable de conduire une étude comparée répondant aux critères de similarités entre les deux groupes de patients.

En outre, nous collectons actuellement les génotypes des patients mucoviscidosiques dont proviennent les biopsies bronchiques et les lames histologiques. En effet, il est probable que le remodelage d'expression protéique observé varie en fonction des mutations des patients. Ainsi, des mutations conduisant à une expression membranaire non fonctionnelle de CFTR peuvent conserver des interactions avec leurs partenaires à domaines PDZ, contrairement à des mutations entraînant une absence totale de CFTR à la membrane. Il est donc concevable que ces deux types de mutations entraînent un remodelage différent. Mais pour vérifier cela, il faudrait conduire une étude à plus grande échelle pour que les principales mutations de CFTR soient représentées par un nombre suffisant de prélèvements. Par ailleurs, les prélèvements utilisés comme contrôles proviennent d'individus non mucoviscidosiques, mais il est possible que certains d'entre eux soient porteurs sains d'une mutation de *CFTR*. Il serait intéressant d'étudier l'influence de l'hétérozygotie sur l'expression protéique de NHE-RF1 et des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis une meilleure connaissance et compréhension du rôle de la protéine partenaire de CFTR, NHE-RF1. Ils ont également permis de démontrer pour la première fois et par des approches complémentaires, la présence du récepteur  $\beta_3$ -adrénergique dans les poumons humains ainsi qu'un profond remodelage de l'expression protéique dans la mucoviscidose. Cependant, l'avancée de mes travaux soulève de nouvelles questions, notamment sur les mécanismes impliqués et le rôle de CFTR dans le remodelage observé dans les bronches des patients mucoviscidosiques.

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adamson IY, Bowden DH. (1974) The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* 30(1): 35-42.
- Ahren B, Lundquist I. (1981) Effects of selective and non-selective beta-adrenergic agents on insulin secretion in vivo. *Eur J Pharmacol* 71(1): 93-104.
- Alberti S, Bohse K, Arndt V, Schmitz A, Hohfeld J. (2004) The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* 15(9): 4003-10.
- Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang XB, Riordan JR. (2002) The first nucleotide binding domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a site of stable nucleotide interaction, whereas the second is a site of rapid turnover. *J Biol Chem* 277: 15419–15425.
- Allen JA, Yu JZ, Donati RJ, Rasenick MM. (2005) Beta-adrenergic receptor stimulation promotes G alpha s internalization through lipid rafts: a study in living cells. *Mol Pharmacol* 67(5): 1493-504.
- Alonso y de los Ruyzes de Fonteca, J. (1606) *Diez Privilegios para Mujeres Preñadas*. Henares, Spain: Alcalá de Henares, p. 212.
- Ambrosio C, Molinari P, Cotecchia S, Costa T. (2000) Catechol-binding serines of beta(2)-adrenergic receptors control the equilibrium between active and inactive receptor states. *Mol Pharmacol* 57(1): 198-210.
- Ames GF, Mimura CS, Shyamala V. (1990) Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from Escherichia coli to human: Traffic ATPases. *FEMS Microbiol Rev* 6(4): 429-46. Review.
- Andersen DH, Hodges RG. (1946) Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of the etiology. *Am J Dis Child* 72: 62-80.
- Anderson CM, Allan J, Johansen PG. (1967) Comments on the possible existence and nature of a heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Bibl Paediatr* 86: 381-387.
- Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. (1991a) Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 67(4): 775-84.
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. (1991b) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253(5016): 202-5.
- Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. (1991c) Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251(4994): 679-82.
- Angelicheva D, Calafell F, Savov A, Jordanova A, Kufardjieva A, Galeva I, Nedkova V, Ivanova T, Yankova P, Konstantinova D, Genev E, Kalaydjieva L. (1997) Cystic fibrosis mutations and associated haplotypes in Bulgaria - a comparative population genetic study. *Hum Genet* 99: 513-20.
- Aris RM, Renner JB, Winders AD, Buell HE, Riggs DB, Lester GE, Ontjes DA. (1998) Increased rate of fractures and severe kyphosis: sequelae of living into adulthood with cystic fibrosis. *Ann Intern Med* 128(3): 186-93.

- Arndt V, Daniel C, Nastainczyk W, Alberti S, Hohfeld J. (2005) BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell* 16(12): 5891-900.
- Asano A, Morimatsu M, Nikami H, Yoshida T, Saito M. (1997) Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem J* 328(Pt 1): 179-83.
- Awayn NH, Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Riordan JR, Ford RC. (2005) Crystallographic and single-particle analyses of native- and nucleotide-bound forms of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): 996-9.
- Bai C, Biwersi J, Verkman AS, Matthay MA. (1998) A mouse model to test the in vivo efficacy of chemical chaperones. *J Pharmacol Toxicol Methods* 40(1): 39-45.
- Baker JG. (2005) Evidence for a secondary state of the human beta3-adrenoceptor. *Mol Pharmacol* 68(6): 1645-55.
- Baker JM, Hudson RP, Kanelis V, Choy WY, Thibodeau PH, Thomas PJ, Forman-Kay JD. (2007) CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat Struct Mol Biol* 14(8): 738-45.
- Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY, Patterson C. (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* 19(6): 4535-45.
- Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D, al-Awqati Q. (1991) Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 352(6330): 70-3.
- Barker PM, Gillie DJ, Schechter MS, Rubin BK. (2005) Effect of macrolides on in vivo ion transport across cystic fibrosis nasal epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 171(8): 868-71.
- Barriere H, Nemes C, Lechardeur D, Khan-Mohammad M, Fruh K, Lukacs GL. (2006) Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in Mammalian cells. *Traffic* 7(3): 282-97.
- Bates E, Miller S, Alexander M, Mazur M, Fortenberry JA, Bebok Z, Sorscher EJ, Rowe SM. (2007) Bioelectric effects of quinine on polarized airway epithelial cells. *J Cyst Fibros* 6(5): 351-9.
- Bebok Z, Mazzochi C, King SA, Hong JS, Sorscher EJ. (1998a) The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J Biol Chem* 273(45): 29873-8.
- Bebok Z, Venglarik CJ, Panczel Z, Jilling T, Kirk KL, Sorscher EJ. (1998b) Activation of DeltaF508 CFTR in an epithelial monolayer. *Am J Physiol* 275(2 Pt 1): C599-607.
- Becq F, Fanjul M, Merten M, Figarella C, Hollande E, Gola M. (1993) Possible regulation of CFTR-chloride channels by membrane-bound phosphatases in pancreatic duct cells. *FEBS Lett* 327(3): 337-42.
- Becq F, Jensen TJ, Chang XB, Savoia A, Rommens JM, Tsui LC, Buchwald M, Riordan JR, Hanrahan JW. (1994) Phosphatase inhibitors activate normal and defective CFTR chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19): 9160-4.

- Becq F, Mettey Y, Gray MA, Galiotta LJ, Dormer RL, Merten M, Metaye T, Chappe V, Marvingt-Mounir C, Zegarra-Moran O, Tarran R, Bulteau L, Derand R, Pereira MM, McPherson MA, Rogier C, Joffre M, Argent BE, Sarrouilhe D, Kammouni W, Figarella C, Verrier B, Gola M, Vierfond JM. (1999) Development of substituted Benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel. *J Biol Chem* 274(39): 27415-25.
- Bednarek SY, Ravazzola M, Hosobuchi M, Amherdt M, Perrelet A, Schekman R, Orci L. (1995) COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell* 83(7): 1183-96.
- Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Bubien JK, Hong J, Tousson A, Clancy JP, Sorscher EJ. (1997) Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* 3(11): 1280-4.
- Benharouga M, Haardt M, Kartner N, Lukacs GL. (2001) COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J Cell Biol* 153(5): 957-70.
- Benharouga M, Sharma M, So J, Haardt M, Drzymala L, Popov M, Schwapach B, Grinstein S, Du K, Lukacs GL. (2003) The role of the C terminus and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor in the functional expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in nonpolarized cells and epithelia. *J Biol Chem* 278(24): 22079-89.
- Bennets HW, Underwood EJ, Shier FL. (1946) A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western Australia. *Aust Vet J* 22: 2-12.
- Bennett WD, Olivier KN, Zeman KL, Hohneker KW, Boucher RC, Knowles MR. (1996) Effect of uridine 5'-triphosphate plus amiloride on mucociliary clearance in adult cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 153(6 Pt 1): 1796-801.
- Berger AL, Randak CO, Ostedgaard LS, Karp PH, Vermeer DW, Welsh MJ. (2005) Curcumin stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel activity. *J Biol Chem* 280(7): 5221-6.
- Berger HA, Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Howard PW, Maurer RA, Mulligan R, Smith AE, Welsh MJ. (1991) Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J Clin Invest* 88(4): 1422-31.
- Berger HA, Travis SM, Welsh MJ. (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 268(3): 2037-47.
- Berkowitz DE, Brown D, Lee KM, Emala C, Palmer D, An Y, Breslow M. (1998) Endotoxin-induced alteration in the expression of leptin and beta3-adrenergic receptor in adipose tissue. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1): E992-7.
- Biwersi J, Emans N, Verkman AS. (1996) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation stimulates endosome fusion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22): 12484-9.
- Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC. (1995) ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol* 268(6 Pt 2): F1132-40.

- Bommakanti RK, Vinayak S, Simonds WF. (2000) Dual regulation of Akt/protein kinase B by heterotrimeric G protein subunits. *J Biol Chem* 275(49): 38870-6.
- Bose S, Malur A, Banerjee AK. (2001) Polarity of human parainfluenza virus type 3 infection in polarized human lung epithelial A549 cells: role of microfilament and microtubule. *J Virol* 75(4): 1984-9.
- Boucher RC, Cheng EH, Paradiso AM, Stutts MJ, Knowles MR, Earp HS. (1989) Chloride secretory response of cystic fibrosis human airway epithelia. Preservation of calcium but not protein kinase C- and A-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 84(5): 1424-31.
- Bradbury NA, Cohn JA, Venglarik CJ, Bridges RJ. (1994) Biochemical and biophysical identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels as components of endocytic clathrin-coated vesicles. *J Biol Chem* 269(11): 8296-302.
- Bradbury NA, Jilling T, Berta G, Sorscher EJ, Bridges RJ, Kirk KL. (1992) Regulation of plasma membrane recycling by CFTR. *Science* 256(5056): 530-2.
- Brown CR, Hong-Brown LQ, Biwersi J, Verkman AS, Welch WJ. (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* 1(2): 117-25.
- Brown CR, Hong-Brown LQ, Welch WJ. (1997) Correcting temperature-sensitive protein folding defects. *J Clin Invest* 99(6): 1432-44.
- Bruscia EM, Price JE, Cheng EC, Weiner S, Caputo C, Ferreira EC, Egan ME, Krause DS. (2006) Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8): 2965-70.
- Bubien JK, Kirk KL, Rado TA, Frizzell RA. (1990) Cell cycle dependence of chloride permeability in normal and cystic fibrosis lymphocytes. *Science* 248(4961): 1416-9.
- Bubien JK. (2001) CFTR may play a role in regulated secretion by lymphocytes: a new hypothesis for the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pflugers Arch* 443 Suppl 1: S36-9.
- Burghardt B, Elkaer ML, Kwon TH, Racz GZ, Varga G, Steward MC, Nielsen S. (2003) Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut* 52(7): 1008-16.
- Cahill P, Nason MW Jr, Ambrose C, Yao TY, Thomas P, Egan ME. (2000) Identification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator domains that are important for interactions with ROMK2. *J Biol Chem* 275(22): 16697-701.
- Camner P, Strandberg K, Philipson K. (1976) Increased mucociliary transport by adrenergic stimulation. *Arch Environ Health* 31(2): 79-82.
- Candido EP, Reeves R, Davie JR. (1978) Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14(1): 105-13.
- Cannon CL, Kowalski MP, Stopak KS, Pier GB. (2003) Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(2): 188-97.

- Cao L, Owsianik G, Jaspers M, Janssens A, Cuppens H, Cassiman JJ, Nilius B. (2003) Functional analysis of CFTR chloride channel activity in cells with elevated MDR1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 304(2): 248-52.
- Cao W, Luttrell LM, Medvedev AV, Pierce KL, Daniel KW, Dixon TM, Lefkowitz RJ, Collins S. (2000) Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation. *J Biol Chem* 275(49): 38131-4.
- Carlisle HJ, Stock MJ. (1991) Effect of conventional (mixed beta 1/beta 2) and novel (beta 3) adrenergic agonists on thermoregulatory behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 40(2): 249-54.
- Carstairs JR, Nimmo AJ, Barnes PJ. (1985) Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtypes in human lung. *Am Rev Respir Dis* 132(3): 541-7.
- Casals T, Vazquez C, Lazaro C, Girbau E, Gimenez FJ, Estivill X. (1992) Cystic fibrosis in the Basque country: high frequency of mutation delta F508 in patients of Basque origin. *Am J Hum Genet* 50: 404-410.
- Castagna I, Roszkowska AM, Fama F, Sinicropi S, Ferreri G. (2001) The eye in cystic fibrosis. *Eur J Ophthalmol* 11(1): 9-14.
- Cerione RA, Codina J, Benovic JL, Lefkowitz RJ, Birnbaumer L, Caron MG. (1984a) The mammalian beta 2-adrenergic receptor: reconstitution of functional interactions between pure receptor and pure stimulatory nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Biochemistry* 23(20): 4519-25.
- Cerione RA, Sibley DR, Codina J, Benovic JL, Winslow J, Neer EJ, Birnbaumer L, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1984b) Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase system. The pure beta-adrenergic receptor and guanine nucleotide regulatory protein confer hormone responsiveness on the resolved catalytic unit. *J Biol Chem* 259(16): 9979-82.
- Champigny G, Imler JL, Puchelle E, Dalemans W, Gribkoff V, Hinnrasky J, Dott K, Barbry P, Pavirani A, Lazdunski M. (1995) A change in gating mode leading to increased intrinsic Cl<sup>-</sup> channel activity compensates for defective processing in a cystic fibrosis mutant corresponding to a mild form of the disease. *EMBO J* 14(11): 2417-23.
- Chang XB, Hou YX, Jensen TJ, Riordan JR. (1994) Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J Biol Chem* 269(28): 18572-5.
- Chang XB, Tabcharani JA, Hou YX, Jensen TJ, Kartner N, Alon N, Hanrahan JW, Riordan JR. (1993) Protein kinase A (PKA) still activates CFTR chloride channel after mutagenesis of all 10 PKA consensus phosphorylation sites. *J Biol Chem* 268(15): 11304-11.
- Chanson M, Berclaz PY, Scerri I, Dudez T, Wernke-Dollries K, Pizurki L, Pavirani A, Fiedler MA, Suter S. (2001) Regulation of gap junctional communication by a pro-inflammatory cytokine in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-expressing but not cystic fibrosis airway cells. *Am J Pathol* 158(5): 1775-84.
- Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P. (1994) Activation of intestinal CFTR Cl<sup>-</sup> channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* 13: 1065-1072.

- Chappe V, Hinkson DA, Howell LD, Evagelidis A, Liao J, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. (2004) Stimulatory and inhibitory protein kinase C consensus sequences regulate the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 390-5.
- Chappe V, Hinkson DA, Zhu T, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. (2003) Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J Physiol* 548(Pt 1): 39-52.
- Chappe V, Mettey Y, Vierfond JM, Hanrahan JW, Gola M, Verrier B, Becq F. (1998) Structural basis for specificity and potency of xanthine derivatives as activators of the CFTR chloride channel. *Br J Pharmacol* 123(4): 683-93.
- Chaudhry A, MacKenzie RG, Georgic LM, Granneman JG. (1994) Differential interaction of beta 1- and beta 3-adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes. *Cell Signal* 6(4): 457-65.
- Chen JH, Chang XB, Aleksandrov AA, Riordan JR. (2002) CFTR is a monomer: biochemical and functional evidence. *J Membr Biol* 188(1): 55-71.
- Chen JH, Schulman H, Gardner P. (1989) A cAMP-regulated chloride channel in lymphocytes that is affected in cystic fibrosis. *Science* 243(4891): 657-60.
- Cheng J, Moyer BD, Milewski M, Loffing J, Ikeda M, Mickle JE, Cutting GR, Li M, Stanton BA, Guggino WB. (2002) A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J Biol Chem* 277(5): 3520-9.
- Cheng J, Wang H, Guggino WB. (2004) Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J Biol Chem* 279(3): 1892-8.
- Cheng J, Wang H, Guggino WB. (2005) Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and protein expression by a Rho family small GTPase TC10. *J Biol Chem* 280(5): 3731-9.
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE. (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63(4): 827-34.
- Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. (1991) Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66(5): 1027-36.
- Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, Crow MT. (2000) The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ Res* 87(12): 1172-9.
- Cheung AH, Huang RR, Graziano MP, Strader CD. (1991) Specific activation of Gs by synthetic peptides corresponding to an intracellular loop of the beta-adrenergic receptor. *FEBS Lett* 279(2): 277-80.
- Cheung KH, Leung CT, Leung GP, Wong PY. (2003) Synergistic effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and aquaporin-9 in the rat epididymis. *Biol Reprod* 68(5): 1505-10.
- Choo-Kang LR, Zeitlin PL. (2001) Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(1): L58-68.

- Chung FZ, Wang CD, Potter PC, Venter JC, Fraser CM. (1988) Site-directed mutagenesis and continuous expression of human beta-adrenergic receptors. Identification of a conserved aspartate residue involved in agonist binding and receptor activation. *J Biol Chem* 263(9): 4052-5.
- Cirino G, Sorrentino R, di Villa Bianca R, Popolo A, Palmieri A, Imbimbo C, Fusco F, Longo N, Tajana G, Ignarro LJ, Mirone V. (2003) Involvement of beta 3-adrenergic receptor activation via cyclic GMP- but not NO-dependent mechanisms in human corpus cavernosum function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5531-6.
- Clain J, Lehmann-Che J, Dugueperoux I, Arous N, Girodon E, Legendre M, Goossens M, Edelman A, de Braekeleer M, Teulon J, Fanen P. (2005) Misprocessing of the CFTR protein leads to mild cystic fibrosis phenotype. *Hum Mutat* 25(4):360-71.
- Clancy JP, Bebok Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM. (2001) Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163(7): 1683-92.
- Cohen BE, Lee G, Jacobson KA, Kim YC, Huang Z, Sorscher EJ, Pollard HB. (1997) 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine and other xanthines differentially bind to the wild-type and delta F508 first nucleotide binding fold (NBF-1) domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 36(21): 6455-61.
- Cohen P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58: 453-508. Review.
- Cohn JA, Strong TV, Picciotto MR, Nairn AC, Collins FS, Fitz JG. (1993) Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bile duct epithelial cells. *Gastroenterology* 105(6): 1857-64.
- Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. (1999) Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 100(22): 2210-2.
- Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Hohfeld J, Patterson C. (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 3(1): 93-6.
- Coraux C, Kileztky C, Polette M, Hinnrasky J, Zahm JM, Devillier P, De Bentzmann S, Puchelle E. (2004) Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(5): 605-12.
- Coraux C, Nawrocki-Raby B, Hinnrasky J, Kileztky C, Gaillard D, Dani C, Puchelle E. (2005) Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32(2): 87-92.
- Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC. (1994) CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10(1): 38-47.
- Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, Higgins CF. (1991) Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20): 9262-6.

- Crawford RM, Treharne KJ, Best OG, Riemen CE, Muimo R, Gruenert DC, Arnaud-Dabernat S, Daniel JY, Mehta A. (2006) NDPK-A (but not NDPK-B) and AMPK alpha1 (but not AMPK alpha2) bind the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell membranes. *Cell Signal* 18(10): 1595-603.
- Cui L, Aleksandrov L, Chang XB, Hou YX, He L, Hegedus T, Gentzsch M, Aleksandrov A, Balch WE, Riordan JR. (2007) Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR. *J Mol Biol* 365(4): 981-94.
- Cuisset L, Tichonicky L, Jaffray P, Delpech M. (1997) The effects of sodium butyrate on transcription are mediated through activation of a protein phosphatase. *J Biol Chem* 272(39): 24148-53.
- Cummings TA, Kinnamon SC. (1992) Apical K<sup>+</sup> channels in Necturus taste cells. Modulation by intracellular factors and taste stimuli. *J Gen Physiol* 99(4): 591-613.
- Cuthbert AW, Halstead J, Ratcliff R, Colledge WH, Evans MJ. (1995) The genetic advantage hypothesis in cystic fibrosis heterozygotes: a murine study. *J Physiol* 482 (Pt 2): 449-454.
- Cuthbert AW, Hickman ME, MacVinish LJ, Evans MJ, Colledge WH, Ratcliff R, Seale PW, Humphrey PP. (1994) Chloride secretion in response to guanylin in colonic epithelial from normal and transgenic cystic fibrosis mice. *Br J Pharmacol* 112: 31-36.
- Cuthbert AW, Hickman ME, Thorn P, MacVinish LJ. (1999) Activation of Ca<sup>2+</sup>- and cAMP-sensitive K<sup>+</sup> channels in murine colonic epithelia by 1-ethyl-2-benzimidazolone. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1): C111-20.
- Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. (1994) Population variation of common cystic Fibrosis mutations. *Hum Mutat* 4: 167-177.
- Dalemans W, Hinrasky J, Slos P, Dreyer D, Fuchey C, Pavirani A, Puchelle E. (1992) Immunocytochemical analysis reveals differences between the subcellular localization of normal and delta Phe508 recombinant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp Cell Res* 201(1): 235-40.
- Danner I, Escande D, Gauthier C. (2001) Beta(3)-adrenoceptors control Cl<sup>-</sup> conductance in rabbit nasal epithelium. *Eur J Pharmacol* 422(1-3): 203-7.
- Davis PB, Braunstein M, Jay C. (1978) Decreased adenosine 3':5'-monophosphate response to isoproterenol in cystic fibrosis leukocytes. *Pediatr Res* 12(6): 703-7.
- Dawson KP, Frossard PM. (2000) A hypothesis regarding the origin and spread of the cystic fibrosis mutation deltaF508. *QJM-An Int J Med* 93(5): 313-5.
- De Boeck K, Weren M, Proesmans M, Kerem E. (2005) Pancreatitis among patients with cystic fibrosis: correlation with pancreatic status and genotype. *Pediatrics* 115(4): e463-9.
- De Braekeleer M, Chaventre A, Bertorelle G, Verlingue C, Ragueneas O, Mercier B, Ferec C. (1996) Linkage disequilibrium between the four most common cystic fibrosis mutations and microsatellite haplotypes in the Celtic population of Brittany. *Hum Genet* 98: 223-227.
- De Gracia J, Mata F, Alvarez A, Casals T, Gatner S, Vendrell M, de la Rosa D, Guarner L, Hermosilla E. (2005) Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax* 60(7): 558-63.

- Dechecchi MC, Nicolis E, Bezzetti V, Vella A, Colombatti M, Assael BM, Mettey Y, Borgatti M, Mancini I, Gambari R, Becq F, Cabrini G. (2007) MPB-07 reduces the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(5): 615-24.
- Delacourt C. (2003) Inflammation and cystic fibrosis. *Arch Pediatr* 10 Suppl 2: S338-S341. Review.
- Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. (1992a) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358(6389): 761-4.
- Denning GM, Ostedgaard LS, Welsh MJ. (1992b) Abnormal localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary cultures of cystic fibrosis airway epithelia. *J Cell Biol* 118(3): 551-9.
- Desigaux L, Gourden C, Bello-Roufai M, Richard P, Oudrhiri N, Lehn P, Escande D, Pollard H, Pitard B. (2005) Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther* 16(7): 821-9.
- Dev KK. (2004) Making protein interactions druggable: targeting PDZ domains. *Nat Rev Drug Discov* 3(12): 1047-56. Review.
- Devor DC, Bridges RJ, Pilewski JM. (2000) Pharmacological modulation of ion transport across wild-type and DeltaF508 CFTR-expressing human bronchial epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 279(2): C461-79.
- Devor DC, Singh AK, Bridges RJ, Frizzell RA. (1996a) Modulation of Cl<sup>-</sup> secretion by benzimidazolones. II. Coordinate regulation of apical GCl and basolateral GK. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): L785-95.
- Devor DC, Singh AK, Frizzell RA, Bridges RJ. (1996b) Modulation of Cl<sup>-</sup> secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channel. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): L775-84.
- Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, Huang P, Tong J, Naren AP, Bindokas V, Palfrey HC, Nelson DJ. (2006) CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* 8(9): 933-44.
- Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. (1953) Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 12: 549-563.
- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, Strader CD. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321(6065): 75-9.
- Dork T, Wulbrand U, Richter T, Neumann T, Wolfes H, Wulf B, Maass G, Tummeler B. (1991) Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet* 87(4): 441-6.
- Dormer RL, Derand R, McNeilly CM, Mettey Y, Bulteau-Pignoux L, Metaye T, Vierfond JM, Gray MA, Galiotta LJ, Morris MR, Pereira MM, Doull IJ, Becq F, McPherson MA. (2001) Correction of

- delF508-CFTR activity with benzo(c)quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells. *J Cell Sci* 114(Pt 22): 4073-81.
- Dowling RB, Johnson M, Cole PJ, Wilson R. (1998) Effect of salmeterol on Haemophilus influenzae infection of respiratory mucosa in vitro. *Eur Respir J* 11(1): 86-90.
- Dowling RB, Rayner CF, Rutman A, Jackson AD, Kanthakumar K, Dewar A, Taylor GW, Cole PJ, Johnson M, Wilson R. (1997) Effect of salmeterol on Pseudomonas aeruginosa infection of respiratory mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 155(1): 327-36.
- Dragomir A, Bjorstad J, Hjelte L, Roomans GM. (2004) Curcumin does not stimulate cAMP-mediated chloride transport in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322(2): 447-51.
- Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM. (1990) Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62(6): 1227-33.
- Drumm ML, Wilkinson DJ, Smit LS, Worrell RT, Strong TV, Frizzell RA, Dawson DC, Collins FS. (1991) Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in Xenopus oocytes. *Science* 254(5039): 1797-9.
- Du K, Sharma M, Lukacs GL. (2005) The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol* 12(1): 17-25.
- Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PL, Carter BJ, Guggino WB. (1992) Defective regulation of outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* 358(6387): 581-4.
- Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glockner-Pagel J, Canny S, Du K, Lukacs GL, Caplan MJ. (2004) Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 304(5670): 600-2.
- Ehrhardt C, Collnot EM, Baldes C, Becker U, Laue M, Kim KJ, Lehr CM. (2006) Towards an in vitro model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o-. *Cell Tissue Res* 323(3): 405-15.
- Eidelman O, Guay-Broder C, van Galen PJ, Jacobson KA, Fox C, Turner RJ, Cabantchik ZI, Pollard HB. (1992) A1 adenosine-receptor antagonists activate chloride efflux from cystic fibrosis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5562-6.
- El Hadri K, Pairault J, Feve B. (1996) Triiodothyronine regulates beta 3-adrenoceptor expression in 3T3-F442A differentiating adipocytes. *Eur J Biochem* 239(2): 519-25.
- Elgavish A. (1991) High intracellular pH in CFPAC: a pancreas cell line from a patient with cystic fibrosis is lowered by retrovirus-mediated CFTR gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 180(1): 342-8.
- Ellsworth RE, Jamison DC, Touchman JW, Chisoe SL, Braden Maduro VV, Bouffard GG, Dietrich NL, Beckstrom-Sternberg SM, Iyer LM, Weintraub LA, Cotton M, Courtney L, Edwards J, Maupin R, Ozersky P, Rohlfing T, Wohldmann P, Miner T, Kemp K, Kramer J, Korf I, Pepin K, Antonacci-Fulton L, Fulton RS, Minx P, Hillier LW, Wilson RK, Waterston RH, Miller W, Green ED. (2000)

- Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1172-7.
- Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. (1989) Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245(4922): 1118-21.
- Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, Cohn JA, Wilson JM. (1992) Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet* 2(3): 240-8.
- Engelhardt JF, Zepeda M, Cohn JA, Yankaskas JR, Wilson JM. (1994) Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest* 93(2): 737-49.
- Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, Lohse MJ. (2001) Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol* 60(4): 712-7.
- Equi AC, Davies JC, Painter H, Hyde S, Bush A, Geddes DM, Alton EW. (2006) Exploring the mechanisms of macrolides in cystic fibrosis. *Respir Med* 100(4): 687-97.
- Eskandari S, Wright EM, Kreman M, Starace DM, Zampighi GA. (1998) Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19): 11235-40.
- Estivill X, Bancells C, Ramos C, the Biomed CF Mutation Analysis Consortium. (1997) Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat* 10: 135-154.
- Evans BA, Papaioannou M, Anastasopoulos F, Summers RJ. (1998) Differential regulation of beta3-adrenoceptors in gut and adipose tissue of genetically obese (ob/ob) C57BL/6J-mice. *Br J Pharmacol* 124(4): 763-71.
- Evans BA, Papaioannou M, Bonazzi VR, Summers RJ. (1996) Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat tissues. *Br J Pharmacol* 117(1): 210-6.
- Evans BA, Papaioannou M, Hamilton S, Summers RJ. (1999) Alternative splicing generates two isoforms of the beta3-adrenoceptor which are differentially expressed in mouse tissues. *Br J Pharmacol* 127(6): 1525-31.
- Evans MJ, Cabral-Anderson LJ, Freeman G. (1978) Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium. *Lab Invest* 38(6): 648-53.
- Fanconi G, Uehlinger E et Knauer C. (1936) Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiectasien. *Wiener Klin Wochens* 86: 753.
- Fanen P, Labarthe R, Garnier F, Benharouga M, Goossens M, Edelman A. (1997) Cystic fibrosis phenotype associated with pancreatic insufficiency does not always reflect the cAMP-dependent chloride conductive pathway defect. Analysis of C225R-CFTR and R1066C-CFTR. *J Biol Chem* 272(48): 30563-6.
- Farber S. (1945) Some organic digestive disturbances in early life. *J Mich State Med Soc* 44: 587-594.

- Ferrari S, Kitson C, Farley R, Steel R, Marriott C, Parkins DA, Scarpa M, Wainwright B, Evans MJ, Colledge WH, Geddes DM, Alton EW. (2001) Mucus altering agents as adjuncts for nonviral gene transfer to airway epithelium. *Gene Ther* 8(18): 1380-6.
- Fève B, Baude B, Krief S, Strosberg AD, Pairault J, Emorine LJ. (1992) Inhibition by dexamethasone of beta 3-adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442A adipocytes. Evidence for a transcriptional mechanism. *J Biol Chem* 267(22): 15909-15.
- Fève B, Elhadri K, Quignard-Boulangé A, Pairault J. (1994) Transcriptional down-regulation by insulin of the beta 3-adrenergic receptor expression in 3T3-F442A adipocytes: a mechanism for repressing the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5677-81.
- Fève B, Emorine LJ, Briend-Sutren MM, Lasnier F, Strosberg AD, Pairault J. (1990) Differential regulation of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor protein and mRNA levels by glucocorticoids during 3T3-F442A adipose differentiation. *J Biol Chem* 265(27): 16343-9.
- Fève B, Pietri-Rouxel F, el Hadri K, Drumare MF, Strosberg AD. (1995) Long term phorbol ester treatment down-regulates the beta 3-adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol Chem* 270(18): 10952-9.
- Finkbeiner WE, Carrier SD, Teresi CE. (1993) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) phenotypic analysis of cell cultures of human tracheal epithelium, tracheobronchial glands, and lung carcinomas. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9(5): 547-56.
- Fischer H, Fukuda N, Barbry P, Illek B, Sartori C, Matthay MA. (2001) Partial restoration of defective chloride conductance in DeltaF508 CF mice by trimethylamine oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(1): L52-7.
- Fischer H, Illek B, Machen TE. (1998) Regulation of CFTR by protein phosphatase 2B and protein kinase C. *Pflugers Arch* 436(2): 175-81.
- Fischer H, Machen TE. (1996) The tyrosine kinase p60c-src regulates the fast gate of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Biophys J* 71(6): 3073-82.
- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. (1998) Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res* 243(2): 359-66.
- Fouassier L, Duan CY, Feranchak AP, Yun CH, Sutherland E, Simon F, Fitz JG, Doctor RB. (2001) Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 is expressed at the apical membrane of rat liver epithelia. *Hepatology* 33(1): 166-76.
- Fouassier L, Nichols MT, Gidey E, McWilliams RR, Robin H, Finnigan C, Howell KE, Housset C, Doctor RB. (2005) Protein kinase C regulates the phosphorylation and oligomerization of ERM binding phosphoprotein 50. *Exp Cell Res* 306(1): 264-73.
- Fouassier L, Yun CC, Fitz JG, Doctor RB. (2000) Evidence for ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) self-association through PDZ-PDZ interactions. *J Biol Chem* 275(32): 25039-45.
- French PJ, Bijman J, Edixhoven M, Vaandrager AB, Scholte BJ, Lohmann SM, Nairn AC, de Jonge HR. (1995) Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 270(44): 26626-31.

- Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. (1987) Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(22): 7920-4.
- Frizzell RA, Rechkemmer G, Shoemaker RL. (1986) Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. *Science* 233(4763): 558-60.
- Frossard PM, Girodon E, Dawson KP, Ghanem N, Plassa F, Lestringant GG, Goossens M. (1998) Identification of cystic fibrosis mutations in the United Arab Emirates. *Hum Mutat* 11(5): 412-3.
- Fu L, Sztul E. (2003) Traffic-independent function of the Sar1p/COPII machinery in proteasomal sorting of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Cell Biol* 160(2): 157-63.
- Fujimura T, Tamura K, Tsutsumi T, Yamamoto T, Nakamura K, Koibuchi Y, Kobayashi M, Yamaguchi O. (1999) Expression and possible functional role of the beta3-adrenoceptor in human and rat detrusor muscle. *J Urol* 161(2): 680-5.
- Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ. (1994) Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* 266: 107-109.
- Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC, Stutts MJ. (1993) CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363(6426): 263-8.
- Gadsby DC, Vergani P, Csanady L. (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440(7083): 477-83. Review.
- Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR, Forman HJ. (1999) Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1): L113-8.
- Gao L, Yankaskas JR, Fuller CM, Sorscher EJ, Matalon S, Forman HJ, Venglarik CJ. (2001) Chlorzoxazone or 1-EBIO increases Na(+) absorption across cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(5): L1123-9.
- Gardner LA, Naren AP, Bahouth SW. (2007) Assembly of an SAP97-AKAP79-cAMP-dependent protein kinase scaffold at the type 1 PSD-95/DLG/ZO1 motif of the human beta(1)-adrenergic receptor generates a receptosome involved in receptor recycling and networking. *J Biol Chem* 282(7): 5085-99.
- Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H. (1998) The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 102(7): 1377-84.
- Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H. (1996) Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 98(2): 556-62.
- Gauthier C, Tavernier G, Trochu JN, Leblais V, Laurent K, Langin D, Escande D, Le Marec H. (1999) Interspecies differences in the cardiac negative inotropic effects of beta(3)-adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 290(2): 687-93.
- Gekko K, Timasheff SN. (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20(16): 4667-76.
- Gentsch M, Chang XB, Cui L, Wu Y, Ozols VV, Choudhury A, Pagano RE, Riordan JR. (2004) Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* 15(6): 2684-96.

- Gentzsch M, Riordan JR. (2001) Localization of sequences within the C-terminal domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator which impact maturation and stability. *J Biol Chem* 276(2): 1291-8.
- Gerhardt CC, Gros J, Strosberg AD, Issad T. (1999) Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by human beta-3 adrenergic receptor: new pharmacological profile and mechanism of activation. *Mol Pharmacol* 55(2): 255-62.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51(5): 1417-23.
- Gibson LE, Cooke RE. (1959) A test for the concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545-549.
- Gilmore ES, Stutts MJ, Milgram SL. (2001) SRC family kinases mediate epithelial Na<sup>+</sup> channel inhibition by endothelin. *J Biol Chem* 276(45): 42610-7.
- Giudicelli Y, Lacasa D, Agli B. (1982) Characteristics of beta-adrenergic-agonist binding to rat adipocyte membranes. Evidence that (+/-)-[3H]hydroxybenzylisoproterenol interacts selectively with the adipocyte beta-adrenergic receptors. *Biochim Biophys Acta* 715(1): 105-15.
- Goddard CA, Ratcliff R, Anderson JR, Glenn E, Brown S, Gill DR, Hyde SC, MacVinish LJ, Huang L, Higgins CF, Cuthbert AW, Evans MJ, Colledge WH. (1997) A second dose of a CFTR cDNA-liposome complex is as effective as the first dose in restoring cAMP-dependent chloride secretion to null CF mice trachea. *Gene Ther* 4(11): 1231-6.
- Goldstein JL, Sahi J, Bhuvra M, Layden TJ, Rao MC. (1994) Escherichia coli heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl<sup>-</sup> secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 107: 950-956.
- Goldstein RF, Niraj A, Sanderson TP, Wilson LS, Rab A, Kim H, Bebok Z, Collawn JF. (2007) VCP/p97 AAA-ATPase does not interact with the endogenous wild-type cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(6): 706-14.
- Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383(6599): 447-50.
- Goti-Iturriaga JL. (1966) ABO group, Rh factor and Lewis-secretor system in Basques. *Rev Clin Esp* 101: 30-40.
- Granneman JG, Lahners KN, Chaudhry A. (1993) Characterization of the human beta 3-adrenergic receptor gene. *Mol Pharmacol* 44(2): 264-70.
- Granneman JG, Lahners KN, Rao DD. (1992) Rodent and human beta 3-adrenergic receptor genes contain an intron within the protein-coding block. *Mol Pharmacol* 42(6): 964-70.
- Granneman JG, Lahners KN. (1994) Analysis of human and rodent beta 3-adrenergic receptor messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 135(3): 1025-31.
- Gribkoff VK, Champigny G, Barbry P, Dworetzky SI, Meanwell NA, Lazdunski M. (1994) The substituted benzimidazolone NS004 is an opener of the cystic fibrosis chloride channel. *J Biol Chem* 269(15): 10983-6.

- Grubb BR, Gabriel SE, Mengos A, Gentsch M, Randell SH, Van Heeckeren AM, Knowles MR, Drumm ML, Riordan JR, Boucher RC. (2006) SERCA pump inhibitors do not correct biosynthetic arrest of deltaF508 CFTR in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34(3): 355-63.
- Gu X, Wang Z, Xu J, Maeda S, Sugita M, Sagawa M, Toga H, Sakuma T. (2006) Denopamine stimulates alveolar fluid clearance via cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat lungs. *Respirology* 11(5): 566-71.
- Guay-Broder C, Jacobson KA, Barnoy S, Cabantchik ZI, Guggino WB, Zeitlin PL, Turner RJ, Vergara L, Eidelman O, Pollard HB. (1995) A1 receptor antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine selectively activates chloride efflux from human epithelial and mouse fibroblast cell lines expressing the cystic fibrosis transmembrane regulator delta F508 mutation. *Biochemistry* 34(28): 9079-87.
- Gudermann T, Schoneberg T, Schultz G. (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 20: 399-427. Review.
- Guerra L, Fanelli T, Favia M, Riccardi SM, Busco G, Cardone RA, Carrabino S, Weinman EJ, Reshkin SJ, Conese M, Casavola V. (2005) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor isoform 1 overexpression modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) expression and activity in human airway 16HBE14o- cells and rescues DeltaF508 CFTR functional expression in cystic fibrosis cells. *J Biol Chem* 280(49): 40925-33.
- Guggino WB, Stanton BA. (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(6): 426-36.
- Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. (1999) C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 274(31): 21873-7.
- Hadorn B, Johansen PG, Anderson CM. (1968) Pancreozymin secretin test of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis and the significance of the result for the pathogenesis of the disease. *Can Med Assoc J* 98(8): 377-85.
- Hadri KE, Charon C, Pairault J, Hauguel-De Mouzon S, Quignard-Boulangé A, Fève B. (1997a) Down-regulation of beta3-adrenergic receptor expression in rat adipose tissue during the fasted/fed transition: evidence for a role of insulin. *Biochem J* 323 ( Pt 2): 359-64.
- Hadri KE, Courtalon A, Gauthereau X, Chambaut-Guerin AM, Pairault J, Fève B. (1997b) Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptor gene expression in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol Chem* 272(39): 24514-21.
- Haggie PM, Stanton BA, Verkman AS. (2004) Increased diffusional mobility of CFTR at the plasma membrane after deletion of its C-terminal PDZ binding motif. *J Biol Chem* 279(7): 5494-500.
- Haggie PM, Verkman AS. (2007) CFTR-independent phagosomal acidification in macrophages. *J Biol Chem* 282(43):31422-8.
- Hajj R, Lesimple P, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Puchelle E, Coraux C. (2007) Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis. *J Pathol* 211(3): 340-50.
- Hall RA, Ostedgaard LS, Premont RT, Blitzer JT, Rahman N, Welsh MJ, Lefkowitz RJ. (1998) A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis

- transmembrane conductance regulator determines binding to the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8496-501.
- Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ. (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* 145(5): 927-32. Review.
- Hallows KR, Raghuram V, Kemp BE, Witters LA, Foskett JK. (2000) Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J Clin Invest* 105(12): 1711-21.
- Hamid QA, Mak JC, Sheppard MN, Corrin B, Venter JC, Barnes PJ. (1991) Localization of beta 2-adrenoceptor messenger RNA in human and rat lung using in situ hybridization: correlation with receptor autoradiography. *Eur J Pharmacol* 206(2): 133-8.
- Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M Jr, Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. (1998) Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr* 132(2): 255-9.
- Hamosh A, Rosenstein BJ, Cutting GR. (1992) CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet* 1(7): 542-4.
- Harada K, Okiyoneda T, Hashimoto Y, Oyokawa K, Nakamura K, Suico MA, Shuto T, Kai H. (2007) Curcumin enhances cystic fibrosis transmembrane regulator expression by down-regulating calreticulin. *Biochem Biophys Res Commun* 353(2): 351-6.
- Harada K, Okiyoneda T, Hashimoto Y, Ueno K, Nakamura K, Yamahira K, Sugahara T, Shuto T, Wada I, Suico MA, Kai H. (2006) Calreticulin negatively regulates the cell surface expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 281(18): 12841-8.
- Harvey BG, Leopold PL, Hackett NR, Grasso TM, Williams PM, Tucker AL, Kaner RJ, Ferris B, Gonda I, Sweeney TD, Ramalingam R, Kovesdi I, Shak S, Crystal RG. (1999) Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 104(9): 1245-55.
- Haworth CS, Selby PL, Webb AK, Dodd ME, Musson H, McL Niven R, Economou G, Horrocks AW, Freemont AJ, Mawer EB, Adams JE. (1999) Low bone mineral density in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 54(11): 961-7.
- He J, Bellini M, Xu J, Castleberry AM, Hall RA. (2004) Interaction with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ligand (CAL) inhibits beta1-adrenergic receptor surface expression. *J Biol Chem* 279(48): 50190-6.
- He Z, Raman S, Guo Y, Reenstra WW. (1998) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation by cAMP-independent mechanisms. *Am J Physiol* 275(4 Pt 1): C958-66.
- Hekman M, Feder D, Keenan AK, Gal A, Klein HW, Pfeuffer T, Levitzki A, Helmreich EJ. (1984) Reconstitution of beta-adrenergic receptor with components of adenylate cyclase. *EMBO J* 3(13): 3339-45.
- Hermans E, Challiss RA. (2001) Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 359(Pt 3): 465-84. Review.

- Hernandez-Gonzalez EO, Trevino CL, Castellano LE, de la Vega-Beltran JL, Ocampo AY, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A. (2007) Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 282(33): 24397-406.
- Hicke L, Riezman H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84(2): 277-87.
- Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A, Gorvoy JD, Quittel L, Friedman KJ, Silverman LM, Boucher RC, Knowles MR. (1994) A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med* 331(15): 974-80.
- Hihnala S, Kujala M, Toppari J, Kere J, Holmberg C, Hoglund P. (2006) Expression of SLC26A3, CFTR and NHE3 in the human male reproductive tract: role in male subfertility caused by congenital chloride diarrhoea. *Mol Hum Reprod* 12(2): 107-11.
- Hillier BJ, Christopherson KS, Prehoda KE, Brecht DS, Lim WA. (1999) Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* 284(5415): 812-5.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. (1993) Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362(6415): 31-8.
- Hogenauer C, Santa Ana CA, Porter JL, Millard M, Gelfand A, Rosenblatt RL, Prestidge CB, Fordtran JS. (2000) Secretion in human carriers of cystic fibrosis mutations: an evaluation of the hypothesis that heterozygotes have subnormal active intestinal chloride secretion. *Am J Hum Genet* 67:1422-1427.
- Holsclaw DS, Perlmutter AD, Jockin H, Shwachman H. (1971) Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol* 106(4): 568-74.
- Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. (2004) Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol* 164(2): 577-88.
- Hopkinson HE, Latif ML, Hill SJ. (2000) Non-competitive antagonism of beta(2)-agonist-mediated cyclic AMP accumulation by ICI 118551 in BC3H1 cells endogenously expressing constitutively active beta(2)-adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 131(1): 124-30.
- Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, Kawai K, Nagata K. (1992) Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol Cell Biol* 12(8): 3490-8.
- Howard M, DuVall MD, Devor DC, Dong JY, Henze K, Frizzell RA. (1995) Epitope tagging permits cell surface detection of functional CFTR. *Am J Physiol* 269(6 Pt 1): C1565-76.
- Howard M, Fischer H, Roux J, Santos BC, Gullans SR, Yancey PH, Welch WJ. (2003) Mammalian osmolytes and S-nitrosoglutathione promote Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein maturation and function. *J Biol Chem* 278(37): 35159-67.
- Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. (1996) Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 2(4): 467-9.
- Hoyer D, Engel G. (1983) Binding of 125I-cyanopindolol to beta-1-adrenoceptors in a high and low affinity state. *J Recept Res* 3(1-2): 45-59.

- Hu LA, Chen W, Martin NP, Whalen EJ, Premont RT, Lefkowitz RJ. (2003) GIPC interacts with the beta1-adrenergic receptor and regulates beta1-adrenergic receptor-mediated ERK activation. *J Biol Chem* 278(28): 26295-301.
- Hu LA, Tang Y, Miller WE, Cong M, Lau AG, Lefkowitz RJ, Hall RA. (2000) beta 1-adrenergic receptor association with PSD-95. Inhibition of receptor internalization and facilitation of beta 1-adrenergic receptor interaction with N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 275(49): 38659-66.
- Hu W, Howard M, Lukacs GL. (2001) Multiple endocytic signals in the C-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem J* 354(Pt 3): 561-72.
- Huang S, Jornot L, Wiszniewski L, Rochat T, Suter S, Lacroix JS, Chanson M. (2003) Src signaling links mediators of inflammation to Cx43 gap junction channels in primary and transformed CFTR-expressing airway cells. *Cell Commun Adhes* 10(4-6): 279-85.
- Hutchinson DS, Bengtsson T, Evans BA, Summers RJ. (2002) Mouse beta 3a- and beta 3b-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells display identical pharmacology but utilize distinct signalling pathways. *Br J Pharmacol* 135(8): 1903-14.
- Hwang TC, Horie M, Gadsby DC. (1993) Functionally distinct phospho-forms underlie incremental activation of protein kinase-regulated Cl<sup>-</sup> conductance in mammalian heart. *J Gen Physiol* 101(5): 629-50.
- Hwang TC, Lu L, Zeitlin PL, Gruenert DC, Haganir R, Guggino WB. (1989) Cl<sup>-</sup> channels in CF: lack of activation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* 244(4910): 1351-3.
- Hwang TH, Schwiebert EM, Guggino WB. (1996) Apical and basolateral ATP stimulates tracheal epithelial chloride secretion via multiple purinergic receptors. *Am J Physiol* 270(6 Pt 1): C1611-23.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346(6282): 362-5.
- Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, Fitzjohn EM, Mofford KA, Waddell BE, Gooi HC, Goddard CA, Hannavy K, Smyth SE, Egan JJ, Sorgi FL, Huang L, Cuthbert AW, Evans MJ, Colledge WH, Higgins CF, Webb AK, Gill DR. (2000) Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 7(13): 1156-65.
- Illek B, Fischer H, Santos GF, Widdicombe JH, Machen TE, Reenstra WW. (1995) cAMP-independent activation of CFTR Cl channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *Am J Physiol* 268(4 Pt 1): C886-93.
- Illek B, Zhang L, Lewis NC, Moss RB, Dong JY, Fischer H. (1999) Defective function of the cystic fibrosis-causing missense mutation G551D is recovered by genistein. *Am J Physiol* 277(4 Pt 1): C833-9.
- Illsley NP, Verkman AS. (1987) Membrane chloride transport measured using a chloride-sensitive fluorescent probe. *Biochemistry* 26(5): 1215-9.
- Ingraffea J, Reczek D, Bretscher A. (2002) Distinct cell type-specific expression of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP: EBP50 is generally expressed with ezrin in specific epithelia, whereas E3KARP is not. *Eur J Cell Biol* 81(2): 61-8.

- Ismailov II, Awayda MS, Jovov B, Berdiev BK, Fuller CM, Dedman JR, Kaetzel M, Benos DJ. (1996) Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 271(9): 4725-32.
- Jacobson KA, Guay-Broder C, van Galen PJ, Gallo-Rodriguez C, Melman N, Jacobson MA, Eidelman O, Pollard HB. (1995) Stimulation by alkylxanthines of chloride efflux in CFPAC-1 cells does not involve A1 adenosine receptors. *Biochemistry* 34(28): 9088-94.
- Jarry TM, Cheung AL. (2006) Staphylococcus aureus escapes more efficiently from the phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. *Infect Immun* 74(5): 2568-77.
- Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83(1): 129-35.
- Jia Y, Mathews CJ, Hanrahan JW. (1997a) Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem* 272(8): 4978-84.
- Jia Y, Seibert F, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. (1997b) Activation of CFTR chloride channels by tyrosine phosphorylation (Abstract). *Pediatr Pulmonol Suppl* 14: 214.
- Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C. (2001) CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* 276(46): 42938-44.
- Jiang Q, Li J, Dubroff R, Ahn YJ, Foskett JK, Engelhardt J, Kleyman TR. (2000) Epithelial sodium channels regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* 275(18): 13266-74.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893): 41-9.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143(7): 1883-98.
- Jouret F, Bernard A, Hermans C, Dom G, Terryn S, Leal T, Lebecque P, Cassiman JJ, Scholte BJ, de Jonge HR, Courtoy PJ, Devuyst O. (2007) Cystic fibrosis is associated with a defect in apical receptor-mediated endocytosis in mouse and human kidney. *J Am Soc Nephrol* 18(3): 707-18.
- Jovov B, Ismailov II, Berdiev BK, Fuller CM, Sorscher EJ, Dedman JR, Kaetzel MA, Benos DJ. (1995) Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J Biol Chem* 270(49): 29194-200.
- Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS. (1968) Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 279(2): 65-9.
- Karjoo M, Bahremand M, Mihandoust G. (1984) Cystic fibrosis in southern Iran. *J Trop Pediatr* 30(4): 195-6.

- Kartner N, Hanrahan JW, Jensen TJ, Naismith AL, Sun SZ, Ackerley CA, Reyes EF, Tsui LC, Rommens JM, Bear CE, Riordan JR. (1991) Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell* 64(4): 681-91.
- Kelley TJ, Al-Nakkash L, Cotton CU, Drumm ML. (1996) Activation of endogenous deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by phosphodiesterase inhibition. *J Clin Invest* 98(2): 513-20.
- Kelley TJ, Al-Nakkash L, Drumm ML. (1995) CFTR-mediated chloride permeability is regulated by type III phosphodiesterases in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13(6): 657-64.
- Kelley TJ, Al-Nakkash L, Drumm ML. (1997a) C-type natriuretic peptide increases chloride permeability in normal and cystic fibrosis airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16(4): 464-70.
- Kelley TJ, Cotton CU, Drumm ML. (1998) Regulation of amiloride-sensitive sodium absorption in murine airway epithelium by C-type natriuretic peptide. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1): L990-6.
- Kelley TJ, Thomas K, Milgram LJ, Drumm ML. (1997b) In vivo activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutant deltaF508 in murine nasal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2604-8.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui TC. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080.
- Kessler WR, Andersen DH. (1951) Heat prostration in fibrocystic disease of the pancreas and other conditions. *Pediatrics* 8: 648-655.
- Kim JY, Han W, Namkung W, Lee JH, Kim KH, Shin H, Kim E, Lee MG. (2004) Inhibitory regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator anion-transporting activities by Shank2. *J Biol Chem* 279(11): 10389-96.
- Knowles M, Gatzky J, Boucher R. (1981) Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 305(25): 1489-95.
- Knowles M, Gatzky J, Boucher R. (1983) Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest* 71(5): 1410-7.
- Knowles MR, Hohneker KW, Zhou Z, Olsen JC, Noah TL, Hu PC, Leigh MW, Engelhardt JF, Edwards LJ, Jones KR, Grossman M, Wilson J, Johnson LG, Boucher RC. (1995) A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 333(13): 823-31.
- Knowlton RG, Cohen-Haguenauer O, Van Cong N, Frezal J, Brown VA, Barker D, Braman JC, Schumm JW, Tsui LC, Buchwald M, Donis-Keller H. (1985) A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318(6044): 380-2.
- Ko SB, Shcheynikov N, Choi JY, Luo X, Ishibashi K, Thomas PJ, Kim JY, Kim KH, Lee MG, Naruse S, Muallem S. (2002) A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in cystic fibrosis. *EMBO J* 21(21): 5662-72.
- Ko SB, Zeng W, Dorwart MR, Luo X, Kim KH, Millen L, Goto H, Naruse S, Soyombo A, Thomas PJ, Muallem S. (2004) Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat Cell Biol* 6(4): 343-50.

- Kobilka BK, Dixon RA, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Sigal IS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1987a) cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(1): 46-50.
- Kobilka BK, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Dixon RA, Keller P, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1987b) Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta 2-adrenergic receptor and their putative promoter regions. *J Biol Chem* 262(15): 7321-7.
- Koike K, Takayanagi I, Ichino T, Koshikawa H, Nagatomo T. (1997) Beta3-adrenoceptors mediate relaxation of guinea pig taenia caecum by BRL37344A and BRL35135A. *Eur J Pharmacol* 334(2-3): 217-21.
- Kong F, Young L, Chen Y, Ran H, Meyers M, Joseph P, Cho YH, Hassett DJ, Lau GW. (2006) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell Microbiol* 8(7): 1121-33.
- König J, Schreiber R, Mall M, Kunzelmann K. (2002) No evidence for inhibition of ENaC through CFTR-mediated release of ATP. *Biochim Biophys Acta* 1565(1): 17-28.
- Konstas AA, Koch JP, Tucker SJ, Korbmacher C. (2002) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent up-regulation of Kir1.1 (ROMK) renal K<sup>+</sup> channels by the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 277(28): 25377-84.
- Kopito LE, Kosasky HJ, Shwachman H. (1973) Water and electrolytes in cervical mucus from patients with cystic fibrosis. *Fertil Steril* 24(7): 512-6.
- Kotsias BA, Peracchia C. (2005) Functional interaction between CFTR and Cx45 gap junction channels expressed in oocytes. *J Membr Biol* 203(3): 143-50.
- Kotsias BA, Salim M, Peracchia LL, Peracchia C. (2006) Interplay between Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator and Gap Junction Channels Made of Connexins 45, 40, 32 and 50 Expressed in Oocytes. *J Membr Biol* 214(1-2): 1-8.
- Kotton DN, Fabian AJ, Mulligan RC. (2005) Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33(4): 328-34.
- Kowalski MP, Dubouix-Bourandy A, Bajmoczy M, Golan DE, Zaidi T, Coutinho-Sledge YS, Gygi MP, Gygi SP, Wiemer EA, Pier GB. (2007) Host resistance to lung infection mediated by major vault protein in epithelial cells. *Science* 317(5834): 130-2.
- Kowalski MP, Pier GB. (2004) Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation. *J Immunol* 172(1): 418-25.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105(3): 369-77.

- Krief S, Feve B, Baude B, Zilberfarb V, Strosberg AD, Pairault J, Emorine LJ. (1994) Transcriptional modulation by n-butyric acid of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic receptor balance in 3T3-F442A adipocytes. *J Biol Chem* 269(9): 6664-70.
- Krief S, Lonnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ. (1993) Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 91(1): 344-9.
- Krishna S, Brown N, Faller DV, Spanjaard RA. (2002) Differential effects of short-chain fatty acids on head and neck squamous carcinoma cells. *Laryngoscope* 112(4): 645-50.
- Kumar N, Robidoux J, Daniel KW, Guzman G, Floering LM, Collins S. (2007) Requirement of vimentin filament assembly for beta3-adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis. *J Biol Chem* 282(12): 9244-50.
- Kunzelmann K, Kiser GL, Schreiber R, Riordan JR. (1997) Inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* 400(3): 341-4.
- Kunzelmann K, Mall M, Briel M, Hipper A, Nitschke R, Ricken S, Greger R. (1997) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> conductance of *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 435(1): 178-81.
- Kuschel M, Zhou YY, Cheng H, Zhang SJ, Chen Y, Lakatta EG, Xiao RP. (1999) G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling. *J Biol Chem* 274(31): 22048-52.
- Kwon SH, Pollard H, Guggino WB. (2007) Knockdown of NHERF1 Enhances Degradation of Temperature Rescued DeltaF508 CFTR from the Cell Surface of Human Airway Cells. *Cell Physiol Biochem* 20(6): 763-772.
- Lacasa D, Agli B, Giudicelli Y. (1985) Direct assessment of beta-adrenergic receptors in intact rat adipocytes by binding of [3H]CGP 12177. Evidence for agonist high-affinity binding complex and for beta 1 and beta 2 receptor subtypes. *Eur J Biochem* 146(2): 339-46.
- Lallemand JY, Stoven V, Annereau JP, Boucher J, Blanquet S, Barthe J, Lenoir G. (1997) Induction by antitumoral drugs of proteins that functionally complement CFTR: a novel therapy for cystic fibrosis? *Lancet* 350(9079): 711-2.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG Jr. (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214(5088): 597-8.
- Lang PH, Lemmer B. (1985) Evidence for two specific affinity states of 3H-antagonist binding to cardiac beta-adrenergic receptors and influence of Gpp(NH)p. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res* 10(4): 341-60.
- Langin D, Ekholm D, Ridderstrale M, Lafontan M, Belfrage P. (1992) cAMP-dependent protein kinase activation mediated by beta 3-adrenergic receptors parallels lipolysis in rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1135(3): 349-52.

- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS. (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 3712-7.
- Lau AG, Hall RA. (2001) Oligomerization of NHE-RF-1 and NHE-RF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation. *Biochemistry* 40(29): 8572-80.
- Leblais V, Demolombe S, Vallette G, Langin D, Baro I, Escande D, Gauthier C. (1999) beta3-adrenoceptor control the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Biol Chem* 274(10): 6107-13.
- Lee JH, Richter W, Namkung W, Kim KH, Kim E, Conti M, Lee MG. (2007) Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors. *J Biol Chem* 282(14): 10414-22.
- Lefrere I, De Coppet P, Camelin JC, Le Lay S, Mercier N, Elshourbagy N, Bril A, Berrebi-Bertrand I, Feve B, Krief S. (2002) Neuropeptide AF and FF modulation of adipocyte metabolism. Primary insights from functional genomics and effects on beta-adrenergic responsiveness. *J Biol Chem* 277(42): 39169-78.
- Lelias JM, Kaghad M, Rodriguez M, Chalon P, Bonnin J, Dupre I, Delpech B, Bensaid M, LeFur G, Ferrara P, Caput D. (1993) Molecular cloning of a human beta 3-adrenergic receptor cDNA. *FEBS Lett* 324(2): 127-30.
- Levesque PC, Hart PJ, Hume JR, Kenyon JL, Horowitz B. (1992) Expression of cystic fibrosis transmembrane regulator Cl<sup>-</sup> channels in heart. *Circ Res* 71(4): 1002-7.
- Li C, Dandridge KS, Di A, Marrs KL, Harris EL, Roy K, Jackson JS, Makarova NV, Fujiwara Y, Farrar PL, Nelson DJ, Tigyi GJ, Naren AP. (2005) Lysophosphatidic acid inhibits cholera toxin-induced secretory diarrhea through CFTR-dependent protein interactions. *J Exp Med* 202(7): 975-86.
- Li C, Ramjeesingh M, Bear CE. (1996a) Purified cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) does not function as an ATP channel. *J Biol Chem* 271(20):11623-6.
- Li C, Ramjeesingh M, Wang W, Garami E, Hewryk M, Lee D, Rommens JM, Galley K, Bear CE. (1996b) ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 271(45): 28463-8.
- Li J, Dai Z, Jana D, Callaway DJ, Bu Z. (2005) Ezrin controls the macromolecular complexes formed between an adapter protein Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 280(45): 37634-43.
- Li J, Poulikakos PI, Dai Z, Testa JR, Callaway DJ, Bu Z. (2007) PKC phosphorylation disrupts NHE-RF autoinhibition and promotes CFTR macromolecular assembly. *J Biol Chem* 282(37): 27086-99.
- Liang W, Fishman PH. (2004) Resistance of the human beta1-adrenergic receptor to agonist-induced ubiquitination: a mechanism for impaired receptor degradation. *J Biol Chem* 279(45): 46882-9.
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17(1): 62-70.

- Liedtke CM, Wang X. (2006) The N-terminus of the WD5 repeat of human RACK1 binds to airway epithelial NHE-RF1. *Biochemistry* 45(34): 10270-7.
- Liggett SB, Schwinn DA. (1991) Multiple potential regulatory elements in the 5' flanking region of the beta 3-adrenergic receptor. *DNA Seq* 2(1): 61-3.
- Lim NF, Dascal N, Labarca C, Davidson N, Lester HA. (1995) A G protein-gated K channel is activated via beta 2-adrenergic receptors and G beta gamma subunits in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 105(3):421-39.
- Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgilis D, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem E, Kerem B. (2007) Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest* 117(3): 683-92.
- Lindemans J, Abels J, Neijens HJ, Kerrebijn KF. (1984) Elevated serum vitamin B12 in cystic fibrosis. *Acta Paediatr Scand* 73(6): 768-71.
- Lindquist JM, Fredriksson JM, Rehnmark S, Cannon B, Nedergaard J. (2000) Beta 3- and alpha1-adrenergic Erk1/2 activation is Src- but not Gi-mediated in Brown adipocytes. *J Biol Chem* 275(30): 22670-7.
- Linsdell P, Hanrahan JW. (1998) Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1): C323-6.
- Linsdell P, Hanrahan JW. (1999) Substrates of multidrug resistance-associated proteins block the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Br J Pharmacol* 126(6): 1471-7.
- Linsdell P, Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW. (1997) Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J Gen Physiol* 110(4): 355-64.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-8.
- Lohi H, Lamprecht G, Markovich D, Heil A, Kujala M, Seidler U, Kere J. (2003) Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(3): C769-79.
- Loirat F, Hazout S, Lucotte G. (1997) G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. *Hum Biol* 69: 419-425.
- Loo MA, Jensen TJ, Cui L, Hou Y, Chang XB, Riordan JR. (1998) Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J* 17(23): 6879-87.
- Loussouarn G, Demolombe S, Mohammad-Panah R, Escande D, Baro I. (1996) Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K<sup>+</sup> currents. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): C1565-73.
- Lu M, Leng Q, Egan ME, Caplan MJ, Boulpaep EL, Giebisch GH, Hebert SC. (2006) CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J Clin Invest* 116(3): 797-807.

- Lukacs GL, Chang XB, Bear C, Kartner N, Mohamed A, Riordan JR, Grinstein S. (1993) The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J Biol Chem* 268(29): 21592-8.
- Lukacs GL, Chang XB, Kartner N, Rotstein OD, Riordan JR, Grinstein S. (1992) The cystic fibrosis transmembrane regulator is present and functional in endosomes. Role as a determinant of endosomal pH. *J Biol Chem* 267(21): 14568-72.
- Lukacs GL, Mohamed A, Kartner N, Chang XB, Riordan JR, Grinstein S. (1994) Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J* 13(24): 6076-86.
- Lukacs GL, Segal G, Kartner N, Grinstein S, Zhang F. (1997) Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem J* 328 ( Pt 2): 353-61.
- Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15(2): 194-222. Review.
- Ma H, Ling BN. (1996) Luminal adenosine receptors regulate amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels in A6 distal nephron cells. *Am J Physiol* 270(5 Pt 2): F798-805.
- Ma T, Vetrivel L, Yang H, Pedemonte N, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ, Verkman AS. (2002) High-affinity activators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride conductance identified by high-throughput screening. *J Biol Chem* 277(40): 37235-41.
- Macpherson H, Keir P, Webb S, Samuel K, Boyle S, Bickmore W, Forrester L, Dorin J. (2005) Bone marrow-derived SP cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo. *J Cell Sci* 118(Pt 11): 2441-50.
- MacPherson H, Keir PA, Edwards CJ, Webb S, Dorin JR. (2006) Following damage, the majority of bone marrow-derived airway cells express an epithelial marker. *Respir Res* 7: 145.
- Maitra R, Hamilton JW. (2007) Altered biogenesis of Delta F508-CFTR following treatment with doxorubicin. *Cell Physiol Biochem* 20(5): 465-72.
- Maitra R, Shaw CM, Stanton BA, Hamilton JW. (2001) Increased functional cell surface expression of CFTR and DeltaF508-CFTR by the anthracycline doxorubicin. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(5): C1031-7.
- Mak JC, Grandordy B, Barnes PJ. (1994) High affinity [3H]formoterol binding sites in lung: characterization and autoradiographic mapping. *Eur J Pharmacol* 269(1): 35-41.
- Mak JC, Nishikawa M, Haddad EB, Kwon OJ, Hirst SJ, Twort CH, Barnes PJ. (1996) Localisation and expression of beta-adrenoceptor subtype mRNAs in human lung. *Eur J Pharmacol* 302(1-3): 215-21.
- Malfrout A, Dab I. (1991) New insights on gastro-oesophageal reflux in cystic fibrosis by longitudinal follow up. *Arch Dis Child* 66(11): 1339-45.
- Mall M, Gonska T, Thomas J, Schreiber R, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Kunzelmann K. (2003) Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> secretion by basolateral K<sup>+</sup> channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Pediatr Res* 53(4): 608-18.

- Marcet B, Becq F, Norez C, Delmas P, Verrier B. (2004) General anesthetic octanol and related compounds activate wild-type and delF508 cystic fibrosis chloride channels. *Br J Pharmacol* 141(6): 905-14.
- Marshall J, Fang S, Ostedgaard LS, O'Riordan CR, Ferrara D, Amara JF, Hoppe H 4th, Scheule RK, Welsh MJ, Smith AE. (1994) Stoichiometry of recombinant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cells and its functional reconstitution into cells in vitro. *J Biol Chem* 269(4): 2987-95.
- Martin CA, Naline E, Bakdach H, Advenier C. (1994) Beta 3-adrenoceptor agonists, BRL 37344 and SR 58611A, do not induce relaxation of human, sheep and guinea-pig airway smooth muscle in vitro. *Eur Respir J* 7(9): 1610-5.
- Mason SJ, Paradiso AM, Boucher RC. (1991) Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br J Pharmacol* 103(3): 1649-56.
- Mastrangeli A, Danel C, Rosenfeld MA, Stratford-Perricaudet L, Perricaudet M, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. (1993) Diversity of airway epithelial cell targets for in vivo recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *J Clin Invest* 91(1): 225-34.
- McCarty NA, Standaert TA, Teresi M, Tuthill C, Launspach J, Kelley TJ, Milgram LJ, Hilliard KA, Regelman WE, Weatherly MR, Aitken ML, Konstan MW, Ahrens RC. (2002) A phase I randomized, multicenter trial of CPX in adult subjects with mild cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 33(2): 90-8.
- McCracken AA, Brodsky JL. (1996) Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 132(3): 291-8.
- McDonald TV, Nghiem PT, Gardner P, Martens CL. (1992) Human lymphocytes transcribe the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene and exhibit CF-defective cAMP-regulated chloride current. *J Biol Chem* 267(5): 3242-8.
- McNeel RL, Mersmann HJ. (1999) Distribution and quantification of beta1-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues. *J Anim Sci* 77(3): 611-21.
- McNicholas CM, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME. (1996) Sensitivity of a renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15): 8083-8.
- McNicholas CM, Nason MW Jr, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME. (1997) A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK2-CFTR interaction. *Am J Physiol* 273(5 Pt 2): F843-8.
- Meacham GC, Lu Z, King S, Sorscher E, Tousson A, Cyr DM. (1999) The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J* 18(6): 1492-505.
- Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM. (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* 3(1): 100-5.
- Meindl RS. (1987) Hypothesis: a selective advantage for cystic fibrosis heterozygotes. *Am J Phys Anthropol* 74: 39-45.

- Melin P, Thoreau V, Norez C, Bilan F, Kitzis A, Becq F. (2004) The cystic fibrosis mutation G1349D within the signature motif LSHGH of NBD2 abolishes the activation of CFTR chloride channels by genistein. *Biochem Pharmacol* 67(12): 2187-96.
- Mennie M, Gilfillan A, Brock DJ, Liston WA. (1995) Heterozygotes for the delta F508 cystic fibrosis allele are not protected against bronchial asthma. *Nat Med* 1: 978-979.
- Mizuno K, Kanda Y, Kuroki Y, Watanabe Y. (2000) The stimulation of beta(3)-adrenoceptor causes phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through a G(s)- but not G(i)-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol* 404(1-2): 63-8.
- Mohamed A, Ferguson D, Seibert FS, Cai HM, Kartner N, Grinstein S, Riordan JR, Lukacs GL. (1997) Functional expression and apical localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in MDCK I cells. *Biochem J* 322 ( Pt 1): 259-65.
- Mohler PJ, Kreda SM, Boucher RC, Sudol M, Stutts MJ, Milgram SL. (1999) Yes-associated protein 65 localizes p62(c-Yes) to the apical compartment of airway epithelia by association with EBP50. *J Cell Biol* 147(4): 879-90.
- Montserrat C, Merten M, Figarella C. (1996) Defective ATP-dependent mucin secretion by cystic fibrosis pancreatic epithelial cells. *FEBS Lett* 393(2-3): 264-8.
- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M, Kalaydjieva L, Angelicheva D, Dancheva R, Romeo G, Russo MP, Garnerone S, Restagno G, Ferrari M, Magnani C, Claustres M, Desgeorges M, Schwartz M, Dallapiccola B, Novelli G, Ferec C, de Arce M, Kere J, Anvret M, Dahl N, Kadasi L. (1994) The origin of the major cystic fibrosis mutation ( $\Delta$ F508) in European populations. *Nat Genet* 7: 169-175.
- Moss RB, Hsu YP, Olds L. (2000) Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 120(3): 518-25.
- Moss RB, Milla C, Colombo J, Accurso F, Zeitlin PL, Clancy JP, Spencer LT, Pilewski J, Waltz DA, Dorkin HL, Ferkol T, Pian M, Ramsey B, Carter BJ, Martin DB, Heald AE. (2007) Repeated Aerosolized AAV-CFTR for Treatment of Cystic Fibrosis: A Randomized Placebo-Controlled Phase 2B Trial. *Hum Gene Ther* 18(8): 726-32.
- Moyer BD, Denton J, Karlson KH, Reynolds D, Wang S, Mickle JE, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Li M, Stanton BA. (1999) A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* 104(10): 1353-61.
- Moyer BD, Duhaime M, Shaw C, Denton J, Reynolds D, Karlson KH, Pfeiffer J, Wang S, Mickle JE, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Li M, Stanton BA. (2000) The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *J Biol Chem* 275(35): 27069-74.
- Moyer BD, Loffing J, Schwiebert EM, Loffing-Cueni D, Halpin PA, Karlson KH, Ismailov II, Guggino WB, Langford GM, Stanton BA. (1998) Membrane trafficking of the cystic fibrosis gene product, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, tagged with green fluorescent protein in madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 273(34): 21759-68.

- Mukherjee C, Lefkowitz RJ. (1976) Desensitization of beta-adrenergic receptors by beta-adrenergic agonists in a cell-free system: resensitization by guanosine 5'-(beta, gamma-imino)triphosphate and other purine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(5): 1494-8.
- Mularoni A, Beck L, Sadir R, Adessi GL, Nicollier M. (1995) Down-regulation by progesterone of CFTR expression in endometrial epithelial cells: a study by competitive RT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 217(3): 1105-11.
- Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T, Tanaka K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* 2(12): 1133-8.
- Mutlu GM, Adir Y, Jameel M, Akhmedov AT, Welch L, Dumasius V, Meng FJ, Zabner J, Koenig C, Lewis ER, Balagani R, Traver G, Sznajder JI, Factor P. (2005) Interdependency of beta-adrenergic receptors and CFTR in regulation of alveolar active Na<sup>+</sup> transport. *Circ Res* 96(9): 999-1005.
- Mutlu GM, Dumasius V, Burhop J, McShane PJ, Meng FJ, Welch L, Dumasius A, Mohebahmadi N, Thakuria G, Hardiman K, Matalon S, Hollenberg S, Factor P. (2004) Upregulation of alveolar epithelial active Na<sup>+</sup> transport is dependent on beta2-adrenergic receptor signaling. *Circ Res* 94(8): 1091-100.
- Nabel EG, Gordon D, Yang ZY, Xu L, San H, Plautz GE, Wu BY, Gao X, Huang L, Nabel GJ. (1992) Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization. *Hum Gene Ther* 3(6): 649-56.
- Nackley AG, Tan KS, Fecho K, Flood P, Diatchenko L, Maixner W. (2007) Catechol-O-methyltransferase inhibition increases pain sensitivity through activation of both beta2- and beta3-adrenergic receptors. *Pain* 128(3):199-208.
- Nagel G, Hwang TC, Nastiuk KL, Nairn AC, Gadsby DC. (1992) The protein kinase A-regulated cardiac Cl<sup>-</sup> channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 360(6399): 81-4.
- Naline E, Bardou M, Devillier P, Molimard M, Dumas M, Chalon P, Manara L, Advenier C. (2000) Inhibition by SR 59119A of isoprenaline-, forskolin- and VIP-induced relaxation of human isolated bronchi. *Pulm Pharmacol Ther* 13(4): 167-74.
- Naren AP, Cobb B, Li C, Roy K, Nelson D, Heda GD, Liao J, Kirk KL, Sorscher EJ, Hanrahan J, Clancy JP. (2003) A macromolecular complex of beta 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 342-6.
- Newnham DM, Ingram CG, Mackie A, Lipworth BJ. (1993) Beta-adrenoceptor subtypes mediating the airways response to BRL 35135 in man. *Br J Clin Pharmacol* 36(6): 567-71.
- Nguyen TD, Canada AT, Heintz GG, Gettys TW, Cohn JA. (1991) Stimulation of secretion by the T84 colonic epithelial cell line with dietary flavonols. *Biochem Pharmacol* 41(12): 1879-86.
- Nguyen TD, Kim US, Perrine SP. (2006) Novel short chain fatty acids restore chloride secretion in cystic fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 342(1): 245-52.
- Norez C, Antigny F, Becq F, Vandebrouck C. (2006a) Maintaining low Ca<sup>2+</sup> level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. *Traffic* 7(5): 562-73.

- Norez C, Noel S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, DeJonge H, Becq F. (2006b) Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett* 580(8): 2081-6.
- Okamoto T, Murayama Y, Hayashi Y, Inagaki M, Ogata E, Nishimoto I. (1991) Identification of a Gs activator region of the beta 2-adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell* 67(4): 723-30.
- Okiyoneda T, Harada K, Takeya M, Yamahira K, Wada I, Shuto T, Suico MA, Hashimoto Y, Kai H. (2004) Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol Biol Cell* 15(2): 563-74.
- Okiyoneda T, Wada I, Jono H, Shuto T, Yoshitake K, Nakano N, Nagayama S, Harada K, Isohama Y, Miyata T, Kai H. (2002) Calnexin Delta 185-520 partially reverses the misprocessing of the Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* 526(1-3): 87-92.
- Olivier JC, Manceau J, Marivingt-Mounir C, Mettey Y, Vierfond JM, Couet W. (2002) Photodegradation study of a new activator of the cystic fibrosis chloride channel, the 6-hydroxy-10-chlorobenzo[c]quinolizinium chloride (MPB-07). *J Pharm Sci* 91(2): 324-30.
- Oppenheimer EA, Case AL, Esterly JR, Rothberg RM. (1970) Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 108(4): 673-4.
- Oppenheimer EH, Esterly JR. (1969) Observations on cystic fibrosis of the pancreas. V. Developmental changes in the male genital system. *J Pediatr* 75(5): 806-11.
- Oppenheimer EH, Esterly JR. (1975) Pathology of cystic fibrosis review of the literature and comparison with 146 autopsied cases. *Perspect Pediatr Pathol* 2: 241-78.
- Ornoy A, Arnon J, Katznelson D, Granat M, Caspi B, Chemke J.(1987) Pathological confirmation of cystic fibrosis in the fetus following prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 28(4): 935-47.
- Ostedgaard LS, Randak C, Rokhlina T, Karp P, Vermeer D, Ashbourne Excoffon KJ, Welsh MJ. (2003) Effects of C-terminal deletions on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in cystic fibrosis airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 1937-42.
- Paasche JD, Attramadal T, Kristiansen K, Oksvold MP, Johansen HK, Huitfeldt HS, Dahl SG, Attramadal H. (2005) Subtype-specific sorting of the ETA endothelin receptor by a novel endocytic recycling signal for G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 67(5): 1581-90.
- Palm D, Munch G, Dees C, Hekman M. (1989) Mapping of beta-adrenoceptor coupling domains to Gs-protein by site-specific synthetic peptides. *FEBS Lett* 254(1-2): 89-93.
- Paradiso AM, Ribeiro CM, Boucher RC. (2001) Polarized signaling via purinoceptors in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J Gen Physiol* 117(1): 53-67.
- Pasyk EA, Foskett JK. (1995) Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* 270(21): 12347-50.
- Pasyk EA, Morin XK, Zeman P, Garami E, Galley K, Huan LJ, Wang Y, Bear CE. (1998) A conserved region of the R domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is important in processing and function. *J Biol Chem* 273(48): 31759-64.

- Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, Caci E, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ, Verkman AS. (2005a) Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* 115(9): 2564-71.
- Pedemonte N, Sonawane ND, Taddei A, Hu J, Zegarra-Moran O, Suen YF, Robins LI, Dicus CW, Willenbring D, Nantz MH, Kurth MJ, Galiotta LJ, Verkman AS. (2005b) Phenylglycine and sulfonamide correctors of defective delta F508 and G551D cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride-channel gating. *Mol Pharmacol* 67(5): 1797-807.
- Picciano JA, Ameen N, Grant BD, Bradbury NA. (2003) Rme-1 regulates the recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(5): C1009-18.
- Picciotto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greengard P, Nairn AC. (1992) Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 267(18): 12742-52.
- Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH. (1998) Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393: 79-82.
- Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB. (1996) Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 271(5245):64-7.
- Pier GB, Grout M, Zaidi TS. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of Pseudomonas aeruginosa from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(22): 12088-93.
- Pind S, Riordan JR, Williams DB. (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 269(17): 12784-8.
- Pippig S, Andexinger S, Daniel K, Puzicha M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ. (1993) Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 268(5): 3201-8.
- Pitcher JA, Hall RA, Daaka Y, Zhang J, Ferguson SS, Hester S, Miller S, Caron MG, Lefkowitz RJ, Barak LS. (1998) The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. *J Biol Chem* 273(20): 12316-24.
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257(5074): 1264-7.
- Poolman EM, Galvani AP. (2007) Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis. *J R Soc Interface* 4(12): 91-8.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. (1992) Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256(5055): 385-7.
- Prince LS, Workman RB Jr, Marchase RB. (1994) Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 5192-6.
- Puchelle E, Gaillard D, Ploton D, Hinnrasky J, Fuchey C, Bouterrin MC, Jacquot J, Dreyer D, Pavirani A, Dalemans W. (1992) Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7(5): 485-91.

- Quaife R, al-Gazali L, Abbas S, Fitzgerald P, Fitches A, Valler D, Old JM. (1994) The spectrum of beta thalassaemia mutations in the UAE national population. *J Med Genet* 31(1): 59-61.
- Quinton PM. (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301(5899): 421-2.
- Quinton PM. (1999) Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev* 79(1 Suppl): S3-S22. Review.
- Raghuram V, Mak DO, Foskett JK. (2001) Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3): 1300-5.
- Ramjeesingh M, Kidd JF, Huan LJ, Wang Y, Bear CE. (2003) Dimeric cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exists in the plasma membrane. *Biochem J* 374(Pt 3): 793-7.
- Ramjeesingh M, Li C, Kogan I, Wang Y, Huan LJ, Bear CE. (2001) A monomer is the minimum functional unit required for channel and ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 40(35): 10700-6.
- Randak C, Auerswald EA, Assfalg-Machleidt I, Reenstra WW, Machleidt W. (1999) Inhibition of ATPase, GTPase and adenylate kinase activities of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by genistein. *Biochem J* 340 ( Pt 1): 227-35.
- Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, Luttrell LM, Cong M, Lefkowitz RJ, Rockman HA. (2003) Protein kinase A and G protein-coupled receptor kinase phosphorylation mediates beta-1 adrenergic receptor endocytosis through different pathways. *J Biol Chem* 278(37): 35403-11.
- Reczek D, Berryman M, Bretscher A. (1997) Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* 139(1): 169-79.
- Reddy MM, Light MJ, Quinton PM. (1999) Activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) requires CFTR Cl<sup>-</sup> channel function. *Nature* 402(6759): 301-4.
- Reddy MM, Quinton PM, Haws C, Wine JJ, Grygorczyk R, Tabcharani JA, Hanrahan JW, Gunderson KL, Kopito RR. (1996) Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science* 271(5257): 1876-9.
- Reddy MM, Quinton PM. (2001) cAMP-independent phosphorylation activation of CFTR by G proteins in native human sweat duct. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(3): C604-13.
- Reddy MM, Sun D, Quinton PM. (2001) Apical heterotrimeric g-proteins activate CFTR in the native sweat duct. *J Membr Biol* 179(1): 51-61.
- Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA, Cantiello HF. (1994) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem* 269(32): 20584-91.
- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, Klinger KW, Smith AE, Welsh MJ. (1990) Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 347(6291): 358-63.

- Rich DP, Berger HA, Cheng SH, Travis SM, Saxena M, Smith AE, Welsh MJ. (1993) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by negative charge in the R domain. *J Biol Chem* 268(27): 20259-67.
- Rich DP, Gregory RJ, Anderson MP, Manavalan P, Smith AE, Welsh MJ. (1991) Effect of deleting the R domain on CFTR-generated chloride channels. *Science* 253(5016): 205-7.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm M, Iannuzzi M, Collins FS, Tsui LC. (1989) Identification of the Cystic Fibrosis gene: cloning and characterization of complementary cDNA. *Science* 245: 1066-1073.
- Robay A, Toumaniantz G, Leblais V, Gauthier C. (2005) Transfected beta3- but not beta2-adrenergic receptors regulate cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity via a new pathway involving the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases. *Mol Pharmacol* 67(3): 648-54.
- Robert R, Thoreau V, Norez C, Cantereau A, Kitzis A, Mettey Y, Rogier C, Becq F. (2004) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel by beta-adrenergic agonists and vasoactive intestinal peptide in rat smooth muscle cells and its role in vasorelaxation. *J Biol Chem* 279(20): 21160-8.
- Rochwerger L, Buchwald M. (1993) Stimulation of the cystic fibrosis transmembrane regulator expression by estrogen in vivo. *Endocrinology* 133(2): 921-30.
- Rodman DM, Zamudio S. (1991) The cystic fibrosis heterozygote: advantage in surviving cholera? *Med Hypotheses* 36: 253-258.
- Romberger DJ, Heires P, Rennard SI, Wyatt TA. (2000) beta-Adrenergic agonist modulation of monocyte adhesion to airway epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(1): L139-47.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1065.
- Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC, Riordan JR. (2004) Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* 279(37): 39051-7.
- Rosenfeld M, Davis R, FitzSimmons S, Pepe M, Ramsey B. (1997) Gender gap in cystic fibrosis mortality. *Am J Epidemiol* 145(9): 794-803.
- Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet L, Guggino WB, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. (1992) In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 68(1): 143-55.
- Rosenstein BJ, Langbaum TS. (1983) Incidence of distal intestinal obstruction syndrome in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2(2): 299-301.
- Rouget C, Breuiller-Fouche M, Mercier FJ, Leroy MJ, Loustalot C, Naline E, Frydman R, Croci T, Morcillo EJ, Advenier C, Bardou M. (2004) The human near-term myometrial beta 3-adrenoceptor but

- not the beta 2-adrenoceptor is resistant to desensitisation after sustained agonist stimulation. *Br J Pharmacol* 141(5): 831-41.
- Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. (1993) Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 75(6): 2419-24.
- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. (2005) Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 352(19): 1992-2001.
- Rubenstein RC, Egan ME, Zeitlin PL. (1997) In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest* 100(10): 2457-65.
- Rubenstein RC, Zeitlin PL. (1998) A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 157(2): 484-90.
- Rubenstein RC, Zeitlin PL. (2000) Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 278(2): C259-67.
- Rubio A, Raasmaja A, Silva JE. (1995) Thyroid hormone and norepinephrine signaling in brown adipose tissue. II: Differential effects of thyroid hormone on beta 3-adrenergic receptors in brown and white adipose tissue. *Endocrinology* 136(8): 3277-84.
- Sakuma T, Folkesson HG, Suzuki S, Okaniwa G, Fujimura S, Matthay MA. (1997) Beta-adrenergic agonist stimulated alveolar fluid clearance in ex vivo human and rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 155(2): 506-12.
- Sakuma T, Okaniwa G, Nakada T, Nishimura T, Fujimura S, Matthay MA. (1994) Alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Am J Respir Crit Care Med* 150(2): 305-10.
- Sakuma T, Tuchihara C, Ishigaki M, Osanai K, Nambu Y, Toga H, Takahashi K, Ohya N, Kurihara T, Matthay MA. (2001) Denopamine, a beta(1)-adrenergic agonist, increases alveolar fluid clearance in ex vivo rat and guinea pig lungs. *J Appl Physiol* 90(1): 10-6.
- Salvi SS. (1999) Alpha1-adrenergic hypothesis for pulmonary hypertension. *Chest* 115(6): 1708-19. Review.
- San H, Yang ZY, Pompili VJ, Jaffe ML, Plautz GE, Xu L, Felgner JH, Wheeler CJ, Felgner PL, Gao X, et al. (1993) Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy. *Hum Gene Ther* 4(6): 781-8.
- Sato M, Horinouchi T, Hutchinson DS, Evans BA, Summers RJ. (2007) Ligand-directed signaling at the {beta}3-adrenoceptor produced by SR59230A relative to receptor agonists. *Mol Pharmacol* 72(5):1359-68.
- Sato M, Hutchinson DS, Bengtsson T, Floren A, Langel U, Horinouchi T, Evans BA, Summers RJ. (2005) Functional domains of the mouse beta3-adrenoceptor associated with differential G protein coupling. *J Pharmacol Exp Ther* 315(3): 1354-61.
- Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ, Kopito RR. (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* 271(2): 635-8.

- Schmitt JM, Stork PJ. (2002) Galpha and Gbeta gamma require distinct Src-dependent pathways to activate Rap1 and Ras. *J Biol Chem* 277(45): 43024-32.
- Schöni MH, Turler K, Kaser H, Kraemer R. (1985) Plasma and urinary catecholamines in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Res* 19(1): 47-52.
- Schoumacher RA, Shoemaker RL, Halm DR, Tallant EA, Wallace RW, Frizzell RA. (1987) Phosphorylation fails to activate chloride channels from cystic fibrosis airway cells. *Nature* 330(6150): 752-4.
- Schreiber R, Greger R, Nitschke R, Kunzelmann K. (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 434(6): 841-7.
- Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Kunzelmann K. (1999) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J Biol Chem* 274(17): 11811-6.
- Schreiber R, Pavenstadt H, Greger R, Kunzelmann K. (2000) Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* 475(3): 291-5.
- Schroeder SA, Gaughan DM, Swift M. (1995) Protection against bronchial asthma by CFTR delta F508 mutation: a heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Nat Med* 1: 703-705.
- Schroeder TH, Lee MM, Yacono PW, Cannon CL, Gerceker AA, Golan DE, Pier GB. (2002) CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10): 6907-12.
- Schultz BD, Bridges RJ, Frizzell RA. (1994) IBMX-induced fast block of CFTR can explain stimulation of deltaF508-CFTR (Abstract). *Pediatr Pulmonol Suppl*10: 205,
- Schultz BD, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. (1999) Pharmacology of CFTR chloride channel activity. *Physiol Rev* 79(1 Suppl): S109-44. Review.
- Schulz S, Jakubiczka S, Kropf S, Nickel I, Muschke P, Kleinstein J. (2006) Increased frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in infertile males. *Fertil Steril* 85(1): 135-8.
- Schwartz M, Sorensen N, Brandt NJ, Hogdall E, Holm T. (1995) High incidence of cystic fibrosis on the Faroe Islands: a molecular and genealogical study. *Hum Genet* 95: 703-706.
- Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. (1999) CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* 79(1 Suppl): S145-66. Review.
- Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB. (1995) CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81(7): 1063-73.
- Schwiebert EM, Kizer N, Gruenert DC, Stanton BA. (1992) GTP-binding proteins inhibit cAMP activation of chloride channels in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 10623-7.
- Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME, Guggino WB. (1998) Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2674-9.

- Seibert FS, Chang XB, Aleksandrov AA, Clarke DM, Hanrahan JW, Riordan JR. (1999) Influence of phosphorylation by protein kinase A on CFTR at the cell surface and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1461(2): 275-83. Review.
- Seifert R, Wenzel-Seifert K, Lee TW, Gether U, Sanders-Bush E, Kobilka BK. (1998) Different effects of G $\alpha$  splice variants on beta2-adrenoreceptor-mediated signaling. The Beta2-adrenoreceptor coupled to the long splice variant of G $\alpha$  has properties of a constitutively active receptor. *J Biol Chem* 273(18): 5109-16.
- Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, Davy N, Bismuth E, Reinert P, Lenoir G, Lesure JF, Rousset JP, Edelman A. (2007) In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med* 5: 5.
- Sermet-Gaudelus I, Vallee B, Urbin I, Torossi T, Marianovski R, Fajac A, Feuillet MN, Bresson JL, Lenoir G, Bernaudin JF, Edelman A. (2002) Normal function of the cystic fibrosis conductance regulator protein can be associated with homozygous (Delta)F508 mutation. *Pediatr Res* 52(5): 628-35.
- Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, Bache KG, Papsin B, Zerangue N, Stenmark H, Lukacs GL. (2004) Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol* 164(6): 923-33.
- Sharma RK, Jeffery PK. (1990) Airway beta-adrenoceptor number in cystic fibrosis and asthma. *Clin Sci (Lond)* 78(4): 409-17.
- Shead EF, Haworth CS, Condliffe AM, McKeon DJ, Scott MA, Compston JE. (2007) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in human bone. *Thorax* 62(7): 650-1.
- Shead EF, Haworth CS, Gunn E, Bilton D, Scott MA, Compston JE. (2006) Osteoclastogenesis during infective exacerbations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 174(3): 306-11.
- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294(5545): 1307-13.
- Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. (1993) Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl<sup>-</sup> channels with altered pore properties. *Nature* 362(6416): 160-4.
- Sheppard DN, Welsh MJ. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79(1 Suppl): S23-45. Review.
- Sheppard JD, Orenstein DM, Chao CC, Butala S, Kowalski RP. (1989) The ocular surface in cystic fibrosis. *Ophthalmology* 96(11): 1624-30.
- Shier WT. (1979) Increased resistance to influenza as a possible source of heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Med Hypotheses* 5: 661-667.
- Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ, Milgram SL. (1998) An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 273(31): 19797-801.
- Silvis MR, Picciano JA, Bertrand C, Weixel K, Bridges RJ, Bradbury NA. (2003) A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator generates a novel internalization sequence and enhances endocytic rates. *J Biol Chem* 278(13): 11554-60.

- Simon RH, Engelhardt JF, Yang Y, Zepeda M, Weber-Pendleton S, Grossman M, Wilson JM. (1993) Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Hum Gene Ther* 4(6): 771-80.
- Singh AK, Devor DC, Gerlach AC, Gondor M, Pilewski JM, Bridges RJ. (2000) Stimulation of Cl(-) secretion by chlorzoxazone. *J Pharmacol Exp Ther* 292(2): 778-87.
- Smith JJ, Welsh MJ. (1992) cAMP stimulates bicarbonate secretion across normal, but not cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Invest* 89(4): 1148-53.
- Smith SN, Middleton PG, Chadwick S, Jaffe A, Bush KA, Rolleston S, Farley R, Delaney SJ, Wainwright B, Geddes DM, Alton EW. (1999) The in vivo effects of milrinone on the airways of cystic fibrosis mice and human subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(1): 129-34.
- Soeder KJ, Snedden SK, Cao W, Della Rocca GJ, Daniel KW, Luttrell LM, Collins S. (1999) The beta3-adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a Gi-dependent mechanism. *J Biol Chem* 274(17): 12017-22.
- Song Y, Sonawane ND, Salinas D, Qian L, Pedemonte N, Galiotta LJ, Verkman AS. (2004) Evidence against the rescue of defective DeltaF508-CFTR cellular processing by curcumin in cell culture and mouse models. *J Biol Chem* 279(39): 40629-33.
- Spilmont C, Hinnrasky J, Zahm JM, Jacquot J, Puchelle E, Kuhry JG. (1996) CFTR is involved in membrane endocytosis but not in fluid-phase and receptor-mediated endocytosis in human respiratory epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227(1): 182-8.
- Steinle JJ, Booz GW, Meininger CJ, Day JN, Granger HJ. (2003) Beta 3-adrenergic receptors regulate retinal endothelial cell migration and proliferation. *J Biol Chem* 278(23): 20681-6.
- Steinle JJ, Zamora DO, Rosenbaum JT, Granger HJ. (2005) Beta 3-adrenergic receptors mediate choroidal endothelial cell invasion, proliferation, and cell elongation. *Exp Eye Res* 80(1): 83-91.
- Stern RC, Doershuk CF, Drumm ML. (1995) 3849+10 kb C-->T mutation and disease severity in cystic fibrosis. *Lancet* 346(8970): 274-6.
- Stratford FL, Pereira MM, Becq F, McPherson MA, Dormer RL. (2003) Benzo(c)quinolizinium drugs inhibit degradation of Delta F508-CFTR cytoplasmic domain. *Biochem Biophys Res Commun* 300(2): 524-30.
- Strickland E, Qu BH, Millen L, Thomas PJ. (1997) The molecular chaperone Hsc70 assists the in vitro folding of the N-terminal nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 272(41): 25421-4.
- Strosberg AD. (1997) Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 421-50. Review.
- Suaud L, Carattino M, Kleyman TR, Rubenstein RC. (2002a) Genistein improves regulatory interactions between G551D-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the epithelial sodium channel in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 277(52): 50341-7.
- Suaud L, Li J, Jiang Q, Rubenstein RC, Kleyman TR. (2002b) Genistein restores functional interactions between Delta F508-CFTR and ENaC in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 277(11): 8928-33.

- Sugita M, Kongo H, Shiba Y. (2004) Molecular dissection of the butyrate action revealed the involvement of mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *Mol Pharmacol* 66(5): 1248-59.
- Sugita M, Yue Y, Foskett JK. (1998) CFTR Cl<sup>-</sup> channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J* 17(4): 898-908.
- Sun F, Hug MJ, Lewarchik CM, Yun CH, Bradbury NA, Frizzell RA. (2000) E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J Biol Chem* 275(38): 29539-46.
- Sun F, Zhang R, Gong X, Geng X, Drain PF, Frizzell RA. (2006) Derlin-1 promotes the efficient degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and CFTR folding mutants. *J Biol Chem* 281(48): 36856-63.
- Swiatecka-Urban A, Boyd C, Coutermarsh B, Karlson KH, Barnaby R, Aschenbrenner L, Langford GM, Hasson T, Stanton BA. (2004) Myosin VI regulates endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 279(36): 38025-31.
- Swiatecka-Urban A, Brown A, Moreau-Marquis S, Renuka J, Coutermarsh B, Barnaby R, Karlson KH, Flotte TR, Fukuda M, Langford GM, Stanton BA. (2005) The short apical membrane half-life of rescued {Delta}F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of {Delta}F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells. *J Biol Chem* 280(44): 36762-72.
- Swiatecka-Urban A, Duhaime M, Coutermarsh B, Karlson KH, Collawn J, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Langford G, Stanton BA. (2002) PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 277(42): 40099-105.
- Swiatecka-Urban A, Talebian L, Kanno E, Moreau-Marquis S, Coutermarsh B, Hansen K, Karlson KH, Barnaby R, Cheney RE, Langford GM, Fukuda M, Stanton BA. (2007) Myosin Vb Is Required for Trafficking of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Rab11a-specific Apical Recycling Endosomes in Polarized Human Airway Epithelial Cells. *J Biol Chem* 282(32): 23725-36.
- Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jacquot J. (1999) Genistein inhibits constitutive and inducible NFkappaB activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am J Pathol* 155(2): 473-81.
- Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. (1991) Phosphorylation-regulated Cl<sup>-</sup> channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352(6336): 628-31.
- Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW. (1993) Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature* 366(6450): 79-82.
- Takeyama K, Tamaoki J, Chiyotani A, Sakai N, Kanemura T, Konno K. (1993) Stimulation of ciliary motility by beta 3-adrenoceptor agonist rabbit tracheal epithelium. *Kokyu To Junkan* 41(10): 993-7.
- Tamaoki J, Chiyotani A, Sakai N, Konno K. (1993a) Stimulation of ciliary motility mediated by atypical beta-adrenoceptor in canine bronchial epithelium. *Life Sci* 53(20): 1509-15.

- Tamaoki J, Tagaya E, Isono K, Nagai A. (1998) Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cAMP-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 248(3): 722-7.
- Tamaoki J, Yamauchi F, Chiyotani A, Yamawaki I, Takeuchi S, Konno K. (1993b) Atypical beta-adrenoceptor- (beta 3-adrenoceptor) mediated relaxation of canine isolated bronchial smooth muscle. *J Appl Physiol* 74(1): 297-302.
- Taouil K, Hinnrasky J, Hologne C, Corlieu P, Klossek JM, Puchelle E. (2003) Stimulation of beta 2-adrenergic receptor increases cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in human airway epithelial cells through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Biol Chem* 278(19): 17320-7.
- Tarran R, Loewen ME, Paradiso AM, Olsen JC, Gray MA, Argent BE, Boucher RC, Gabriel SE. (2002) Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> conductances. *J Gen Physiol* 120(3): 407-18.
- Thelin WR, Chen Y, Gentsch M, Kreda SM, Sallee JL, Scarlett CO, Borchers CH, Jacobson K, Stutts MJ, Milgram SL. (2007) Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J Clin Invest* 117(2): 364-74.
- Thomas RF, Holt BD, Schwinn DA, Liggett SB. (1992) Long-term agonist exposure induces upregulation of beta 3-adrenergic receptor expression via multiple cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4490-4.
- Tobacman JK. (2003) Does deficiency of arylsulfatase B have a role in cystic fibrosis? *Chest* 123: 2130-2139.
- Tokumitsu S, Tokumitsu K, Fishman WH. (1981) Intracellular alkaline phosphatase activity in cultured human cancer cells. *Histochemistry* 73(1): 1-13.
- Tommasini R, Evers R, Vogt E, Mornet C, Zaman GJ, Schinkel AH, Borst P, Martinoia E. (1996) The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6743-8.
- Trapnell BC, Chu CS, Paakko PK, Banks TC, Yoshimura K, Ferrans VJ, Chernick MS, Crystal RG. (1991) Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the respiratory tract of normal individuals and individuals with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(15): 6565-9.
- Travis SM, Berger HA, Welsh MJ. (1997) Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 11055-60.
- Treize AE, Linder CC, Grieger D, Thompson EW, Meunier H, Griswold MD, Buchwald M. (1993) CFTR expression is regulated during both the cycle of the seminiferous epithelium and the oestrous cycle of rodents. *Nat Genet* 3(2): 157-64.
- Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Beverelli F, Le Marec H, Berdeaux A, Gauthier C. (1999) Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 128(1): 69-76.

- Uezono Y, Bradley J, Min C, McCarty NA, Quick M, Riordan JR, Chavkin C, Zinn K, Lester HA, Davidson N. (1993) Receptors that couple to 2 classes of G proteins increase cAMP and activate CFTR expressed in *Xenopus* oocytes. *Receptors Channels* 1(3): 233-41.
- Vaandrager AB, Ehlert EM, Jarchau T, Lohmann SM, de Jonge HR. (1996) N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *J Biol Chem* 271(12): 7025-9.
- Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EM, Bot AG, Edixhoven M, Boomaars WE, Lohmann SM, de Jonge HR. (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): 1466-71.
- Vaandrager AB, Tilly BC, Smolenski A, Schneider-Rasp S, Bot AG, Edixhoven M, Scholte BJ, Jarchau T, Walter U, Lohmann SM, Poller WC, de Jonge HR. (1997) cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Ibeta. *J Biol Chem* 272(7): 4195-200.
- Vais H, Zhang R, Reenstra WW. (2004) Dibasic phosphorylation sites in the R domain of CFTR have stimulatory and inhibitory effects on channel activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(3): C737-45.
- Van de Vosse E, Ali S, de Visser AW, Surjadi C, Widjaja S, Vollaard AM, van Dissel JT. (2005) Susceptibility to typhoid fever is associated with a polymorphism in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Hum Genet* 118: 138-140.
- Van der Ven K, Messer L, van der Ven H, Jeyendran RS, Ober C. (1996) Cystic fibrosis mutation screening in healthy men with reduced sperm quality. *Hum Reprod* 11(3): 513-7.
- Van Spronsen A, Nahmias C, Krief S, Briend-Sutren MM, Strosberg AD, Emorine LJ. (1993) The promoter and intron/exon structure of the human and mouse beta 3-adrenergic-receptor genes. *Eur J Biochem* 213(3): 1117-24.
- Vandebrouck C, Melin P, Norez C, Robert R, Guibert C, Mettey Y, Becq F. (2006) Evidence that CFTR is expressed in rat tracheal smooth muscle cells and contributes to bronchodilation. *Respir Res* 7: 113.
- Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 1(1): 13-29. Review.
- Verhaeghe C, Tabruyn SP, Oury C, Bours V, Griffioen AW. (2007) Intrinsic pro-angiogenic status of cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 356(3): 745-9.
- Viard P, Macrez N, Mironneau C, Mironneau J. (2001) Involvement of both G protein alphas and beta gamma subunits in beta-adrenergic stimulation of vascular L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Br J Pharmacol* 132(3): 669-76.
- Vij N, Fang S, Zeitlin PL. (2006) Selective inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator and suppresses interleukin-8 levels: therapeutic implications. *J Biol Chem* 281(25): 17369-78.
- Wang F, Zeltwanger S, Hu S, Hwang TC. (2000) Deletion of phenylalanine 508 causes attenuated phosphorylation-dependent activation of CFTR chloride channels. *J Physiol* 524 Pt 3: 637-48.

- Wang F, Zeltwanger S, Yang IC, Nairn AC, Hwang TC. (1998) Actions of genistein on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. Evidence for two binding sites with opposite effects. *J Gen Physiol* 111(3): 477-90.
- Wang G, Bunnell BA, Painter RG, Quiniones BC, Tom S, Lanson NA Jr, Spees JL, Bertucci D, Peister A, Weiss DJ, Valentine VG, Prockop DJ, Kolls JK. (2005) Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(1): 186-91.
- Wang S, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB, Li M. (1998) Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett* 427(1): 103-8.
- Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB, Li M. (2000) Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 103(1): 169-79.
- Wang X, Venable J, LaPointe P, Hutt DM, Koulov AV, Coppinger J, Gurkan C, Kellner W, Matteson J, Plutner H, Riordan JR, Kelly JW, Yates JR 3rd, Balch WE. (2006) Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* 127(4): 803-15.
- Wang XF, Tsang LL, So SC, Chan HC. (2001) Suppression of ATP-induced Cl<sup>-</sup> secretion by enhanced expression of epithelial Na<sup>+</sup> channels in mouse endometrial epithelium. *Cell Biol Int* 25(10): 1017-20.
- Wang XF, Zhou CX, Shi QX, Yuan YY, Yu MK, Ajonuma LC, Ho LS, Lo PS, Tsang LL, Liu Y, Lam SY, Chan LN, Zhao WC, Chung YW, Chan HC. (2003) Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat Cell Biol* 5(10): 902-6.
- Ward CL, Kopito RR. (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* 269(41): 25710-8
- Ward CL, Krouse ME, Gruenert DC, Kopito RR, Wine JJ. (1991) Cystic fibrosis gene expression is not correlated with rectifying Cl<sup>-</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(12): 5277-81.
- Ward CL, Omura S, Kopito RR. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83(1): 121-7.
- Webber SE, Stock MJ. (1992) Evidence for an atypical, or beta 3-adrenoceptor in ferret tracheal epithelium. *Br J Pharmacol* 105(4): 857-62.
- Wegele H, Wandinger SK, Schmid AB, Reinstein J, Buchner J. (2006) Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J Mol Biol* 356(3): 802-11.
- Wei L, Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ, Droogmans G, Nilius B. (2001) The C-terminal part of the R-domain, but not the PDZ binding motif, of CFTR is involved in interaction with Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Pflugers Arch* 442(2): 280-5.
- Wei L, Vankeerberghen A, Cuppens H, Eggermont J, Cassiman JJ, Droogmans G, Nilius B. (1999) Interaction between calcium-activated chloride channels and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch* 438(5): 635-41.

- Wei LY, Stutts MJ, Hoffman MM, Roepe PD. (1995) Overexpression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in NIH 3T3 cells lowers membrane potential and intracellular pH and confers a multidrug resistance phenotype. *Biophys J* 69(3): 883-95.
- Weixel KM, Bradbury NA. (2000) The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J Biol Chem* 275(5): 3655-60.
- Welsh MJ, Tsui LP, Boat TF, Beaudet AL. (1995) Cystic fibrosis. In Scriver, C.R. *et al.* (eds), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, vol. III: 3799-3876.
- Weyler RT, Yurko-Mauro KA, Rubenstein R, Kollen WJ, Reenstra W, Altschuler SM, Egan M, Mulberg AE. (1999) CFTR is functionally active in GnRH-expressing GT1-7 hypothalamic neurons. *Am J Physiol* 277(3 Pt 1): C563-71.
- Whalen EJ, Foster MW, Matsumoto A, Ozawa K, Violin JD, Que LG, Nelson CD, Benhar M, Keys JR, Rockman HA, Koch WJ, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Stamler JS. (2007) Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Cell* 129(3): 511-22.
- Widdicombe JH. (1986) Cystic fibrosis and beta-adrenergic response of airway epithelial cell cultures. *Am J Physiol* 251(4 Pt 2): R818-22.
- Wilkinson DJ, Strong TV, Mansoura MK, Wood DL, Smith SS, Collins FS, Dawson DC. (1997) CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Am J Physiol* 273(1 Pt 1): L127-33.
- Wilschanski M, Famini C, Blau H, Rivlin J, Augarten A, Avital A, Kerem B, Kerem E. (2000) A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. *Am J Respir Crit Care Med* 161(3 Pt 1): 860-5.
- Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E. (2003) Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 349(15): 1433-41.
- Winpenny JP, McAlroy HL, Gray MA, Argent BE. (1995) Protein kinase C regulates the magnitude and stability of CFTR currents in pancreatic duct cells. *Am J Physiol* 268(4 Pt 1): C823-8.
- Wolde M, Fellows A, Cheng J, Kivenson A, Coutermarsh B, Talebian L, Karlson K, Piserchio A, Mierke DF, Stanton BA, Guggino WB, Madden DR. (2007) Targeting CAL as a negative regulator of DeltaF508-CFTR cell-surface expression: an RNA interference and structure-based mutagenetic approach. *J Biol Chem* 282(11): 8099-109.
- Wong LB, Miller IF, Yeates DB. (1988) Stimulation of ciliary beat frequency by autonomic agonists: in vivo. *J Appl Physiol* 65(2): 971-81.
- Wright JM, Zeitlin PL, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB. (2004) Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line demonstrates a major influence on heat-shock proteins. *Physiol Genomics* 16(2): 204-11.
- Wu, B. J., H. C. Hurst, N. C. Jones, and R. I. Morimoto. (1986) The E1A 13S product of adenovirus 5 activates transcription of the cellular human HSP70 gene. *Mol Cell Biol* 6: 2994-2999.

- Xiao RP, Avdonin P, Zhou YY, Cheng H, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Lakatta EG. (1999) Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res* 84(1): 43-52.
- Xu J, Paquet M, Lau AG, Wood JD, Ross CA, Hall RA. (2001) Beta 1-adrenergic receptor association with the synaptic scaffolding protein membrane-associated guanylate kinase inverted-2 (MAGI-2). Differential regulation of receptor internalization by MAGI-2 and PSD-95. *J Biol Chem* 276(44): 41310-7.
- Xu WM, Shi QX, Chen WY, Zhou CX, Ni Y, Rowlands DK, Yi Liu G, Zhu H, Ma ZG, Wang XF, Chen ZH, Zhou SC, Dong HS, Zhang XH, Chung YW, Yuan YY, Yang WX, Chan HC. (2007) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is vital to sperm fertilizing capacity and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(23): 9816-21.
- Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. (1997) The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24(5): 544-7.
- Yamazaki J, Britton F, Collier ML, Horowitz B, Hume JR. (1999) Regulation of recombinant cardiac cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by protein kinase C. *Biophys J* 76(4): 1972-87.
- Yang H, Shelat AA, Guy RK, Gopinath VS, Ma T, Du K, Lukacs GL, Taddei A, Folli C, Pedemonte N, Galiotta LJ, Verkman AS. (2003) Nanomolar affinity small molecule correctors of defective Delta F508-CFTR chloride channel gating. *J Biol Chem* 278(37): 35079-85.
- Yang Y, Devor DC, Engelhardt JF, Ernst SA, Strong TV, Collins FS, Cohn JA, Frizzell RA, Wilson JM. (1993a) Molecular basis of defective anion transport in L cells expressing recombinant forms of CFTR. *Hum Mol Genet* 2(8): 1253-61.
- Yang Y, Janich S, Cohn JA, Wilson JM. (1993b) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20): 9480-4.
- Yang-Feng TL, Xue FY, Zhong WW, Cotecchia S, Frielle T, Caron MG, Lefkowitz RJ, Francke U. (1990) Chromosomal organization of adrenergic receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4): 1516-20.
- Yoo D, Flagg TP, Olsen O, Raghuram V, Foskett JK, Welling PA. (2004) Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* 279(8): 6863-73.
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Chu CS, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. (1991b) Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. *Nucleic Acids Res* 19(19): 5417-23.
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. (1991a) The cystic fibrosis gene has a "housekeeping"-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin. *J Biol Chem* 266(14): 9140-4.
- Yoshimura K, Rosenfeld MA, Nakamura H, Scherer EM, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. (1992) Expression of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in the mouse lung after in vivo intratracheal plasmid-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res* 20(12): 3233-40.

- Younger JM, Chen L, Ren HY, Rosser MF, Turnbull EL, Fan CY, Patterson C, Cyr DM. (2006) Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* 126(3): 571-82.
- Younger JM, Ren HY, Chen L, Fan CY, Fields A, Patterson C, Cyr DM. (2004) A foldable CFTR{Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. *J Cell Biol* 167(6): 1075-85.
- Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ. (1993) Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 75(2): 207-16.
- Zeitlin PL, Diener-West M, Rubenstein RC, Boyle MP, Lee CK, Brass-Ernst L. (2002) Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate. *Mol Ther* 6(1): 119-26.
- Zhang XM, Wang XT, Yue H, Leung SW, Thibodeau PH, Thomas PJ, Guggino SE. (2003) Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 278(51): 51232-42.
- Zhang ZR, Cui G, Liu X, Song B, Dawson DC, McCarty NA. (2005) Determination of the functional unit of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. One polypeptide forms one pore. *J Biol Chem* 280(1): 458-68.
- Zhou H, Tate SS, Palmer LG. (1994) Primary structure and functional properties of an epithelial K channel. *Am J Physiol* 266(3 Pt 1): C809-24.
- Zhu T, Dahan D, Evagelidis A, Zheng S, Luo J, Hanrahan JW. (1999) Association of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 274(41): 29102-7.
- Zilberfarb V, Pietri-Rouxel F, Jockers R, Krief S, Delouis C, Issad T, Strosberg AD. (1997) Human immortalized brown adipocytes express functional beta3-adrenoceptor coupled to lipolysis. *J Cell Sci* 110 ( Pt 7): 801-7.
- Zimmermann P. (2006) The prevalence and significance of PDZ domain-phosphoinositide interactions. *Biochim Biophys Acta* 1761(8): 947-56.
- Zuelzer WW, Newton WA. (1949) The pathogenesis of fibrocystic disease of the pancreas. *Pediatrics* 4: 53-69.

**ANNEXE**

Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo  
to pathological skeletal muscles.

[Richard P, Bossard F, Desigaux L, Lanctin C, Bello-Roufai M, Pitard B.](#)

**Hum Gene Ther. 2005 Nov;16(11):1318-24.**

---

Discovery of alpha-aminoazaheterocycle-methylglyoxal  
adducts as a new class of high-affinity inhibitors of cystic  
fibrosis transmembrane conductance regulator chloride  
channels.

[Routaboul C, Norez C, Melin P, Molina MC, Boucherle B, Bossard F, Noel S,  
Robert R, Gauthier C, Becq F, Décout JL.](#)

**J Pharmacol Exp Ther. 2007 Sep;322(3):1023-35.**

La mucoviscidose :  
Correction de la mutation  $\Delta F508$  par sur-expression de NHE-RF1 ;  
Modifications d'expression de NHE-RF1 et des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques  
dans les poumons humains.

---

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Ces travaux de thèse se sont organisés autour de deux projets. Premièrement, nous avons étudié l'impact d'une protéine partenaire de CFTR, NHE-RF1, sur la protéine mutée la plus fréquente dans la mucoviscidose:  $\Delta F508$ . NHE-RF1 était décrite jusque là pour son implication dans l'adressage apical et la stabilité membranaire de la protéine CFTR sauvage. Nos travaux démontrent que la surexpression de NHE-RF1 corrige le défaut d'adressage de  $\Delta F508$  et restaure une activité partielle de canal chlorure.

Deuxièmement, nous nous sommes intéressés à l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR) et NHE-RF1 dans les poumons humains témoins et mucoviscidosiques. En effet, les  $\beta_1$  et  $\beta_2$ -AR sont présents dans les poumons où ils régulent diverses fonctions biologiques. Mais dans la mucoviscidose, la réponse  $\beta$ -adrénergique globale est altérée. Par ailleurs, notre équipe a démontré que le troisième sous-type de  $\beta$ -AR,  $\beta_3$ -AR, est capable d'activer CFTR. Mais aucune étude ne démontre la présence de  $\beta_3$ -AR dans les poumons humains. Ces données nous ont conduits à analyser l'expression des trois  $\beta$ -AR ainsi que NHE-RF1 dans des bronches humaines contrôles et mucoviscidosiques. Nous avons ainsi démontré : 1) l'expression du  $\beta_3$ -AR dans les poumons humains et 2) une modification d'expression des  $\beta$ -AR et de NHE-RF1 dans la mucoviscidose (surexpression des  $\beta_1$  et  $\beta_3$ -AR, sous-expression des  $\beta_2$ -AR et NHE-RF1). L'implication physiopathologique de ce remodelage dans la mucoviscidose reste à définir. Enfin, la sous-expression de NHE-RF1 devra être prise en compte pour les possibilités de restauration pharmacologique des mutations chez les patients.

---

MOTS-CLÉS : mucoviscidose, CFTR, NHE-RF1, trafic cellulaire, bronches, poumons, remodelage, récepteurs bêta-adrénergiques.

---

Cystic fibrosis:  
 $\Delta F508$  mutation rescue by NHE-RF1 over-expression ;  
NHE-RF1 and  $\beta$ -adrenergic receptors remodeling in human lungs.

---

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

The present work encompasses two projects. Firstly, we studied the impact of a protein partner of CFTR, NHE-RF1, on the most frequent mutant in cystic fibrosis (CF):  $\Delta F508$ . NHE-RF1 has been described up to now for its involvement in apical trafficking and membrane stability of wild-type CFTR. Our study showed that NHE-RF1 overexpression rescued the trafficking defect of  $\Delta F508$  and rehabilitated a partial channel chloride activity.

Secondly, we focused on the expression of the  $\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) and NHE-RF1 in control and CF human lungs. Indeed, the  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -AR are largely expressed in the lungs where they control various biological functions. But the  $\beta$ -AR stimulation leads to a faded response in CF. In addition, our team has previously shown that the third  $\beta$ -AR subtype,  $\beta_3$ -AR, can activate CFTR. But no study has shown the presence of the  $\beta_3$ -AR in human lungs. These data encouraged us to analyze the three  $\beta$ -AR and NHE-RF1 expressions in human control and CF bronchi samples. We thus showed that: 1)  $\beta_3$ -AR were expressed in human lungs and 2) a remodeling was observed in CF ( $\beta_1$  and  $\beta_3$ -AR overexpression,  $\beta_2$ -AR and NHE-RF1 under-expression). The physiological relevance of this remodeling remains to be defined. However, NHE-RF1 under-expression should be taken into account for the pharmacological rescue of the patients' mutants.

---

KEYWORDS: Cystic Fibrosis, CFTR, NHE-RF1, cellular trafficking, bronchus, lung, remodeling, beta-adrenergic receptors.

---