



HAL
open science

Identification d'une nouvelle voie de dégradation dépendante du GTP dans le réticulum endoplasmique : cas de la protéine mutée CFTR-F508del

Béatrice de Keukeleire

► **To cite this version:**

Béatrice de Keukeleire. Identification d'une nouvelle voie de dégradation dépendante du GTP dans le réticulum endoplasmique : cas de la protéine mutée CFTR-F508del. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00178339

HAL Id: tel-00178339

<https://theses.hal.science/tel-00178339>

Submitted on 10 Oct 2007

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

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

Université Joseph Fourier-GRENOBLE1

UFR de BIOLOGIE

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR ès SCIENCE DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire et Intégrative

Présentée et soutenue publiquement

Par

Béatrice De Keukeleire

Le 28 septembre 2007

Titre :

**Identification d'une voie de dégradation dépendante du GTP
dans le réticulum endoplasmique :**

Cas de la protéine CFTR-F508del

Directeur de thèse :

Dr. Mohamed BENHAROUGA

Jury :

Président : Pr. Michel ROBERT NICOUD

Rapporteur : Pr. Frédéric BECQ

Rapporteur : Dr. Pascale FANEN

Examineur : Dr. Marc CHANSON

Examineur : Dr. Jean-Jacques FEIGE

Directeur de thèse : Dr. Mohamed BENHAROUGA

*A ma mère :
Sans son amour je ne serai pas arrivée à ce niveau*

*A mon père :
Qui, j'espère, serait fier de moi*

*A mes sœurs :
Qui je sais, seront toujours là pour moi*

Remerciements

Je remercie tout d'abord Mme le Docteur Pascale Fanen et Mr le Professeur Frédéric Becq de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de mon manuscrit de doctorat. J'associe à ces remerciements Mr le Docteur Marc Chanson et Mr le Docteur Jean-Jacques Feige ainsi que Mr le Professeur Michel Robert-Nicoud pour avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour avoir consacré une partie de votre temps à lire et juger ce travail.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude au Docteur Florent Guillain pour m'avoir accueillie au sein de l'ex BMC et au Docteur Elisabeth Mintz pour m'avoir soutenue dans mes choix. Merci de m'avoir donné la chance d'apprendre ce qu'est un laboratoire de recherche avec tout ce que cela comporte.

Je remercie le Docteur Mohamed Benharouga pour m'avoir accueilli au sein de son groupe mais également pour la confiance qu'il m'a témoigné pendant ces 4 années.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du laboratoire, anciens et nouveaux, et plus particulièrement :

Francesca, tu seras toujours comme une seconde maman pour moi, tu as toujours été là pour m'écouter, me reconforter, me conseiller. Merci pour tout, jamais je ne t'oublierai.

Caroline, toutes nos discussions, nos petits délires et nos paris vont me manquer. D'ailleurs il en reste quelques uns en suspend ;-) Merci d'avoir toujours été là pour moi.

Sandrine, ma partenaire d'infortune dans ce monde d'homme, je te laisse seule avec ces deux lascars qui se reconnaîtront. Merci d'avoir apporté ta joie et ta bonne humeur ainsi que tes bons conseils.

Julien, ta classe va me manquer, mais je tiens juste à te préciser que le verbe nettoyer se trouve dans le dictionnaire, si tu ne sais toujours pas ce qu'il signifie, et le mieux c'est d'utiliser l'éponge et le détergent qui sont à côté de l'évier... A méditer.

Heidi, Anne-Emmanuelle, Johanna, Simon, Julien, Estelle, Aurélie, Babeth et tous les autres, pour les merveilleux moments passés au laboratoire lors des fêtes de Noël et les innombrables pots.

Michelle, notre bien aimée secrétaire qu'est ce que tu nous manques, tu savais tellement bien t'occuper de nous. Merci pour ta patience face aux problèmes administratifs et pour m'avoir aidée dans toutes ces démarches ; désolées pour toutes ces commandes de dernier délai.

Lors de ma thèse j'ai découvert les joies de l'associatif avec ³⁸globule et aitap. Ce fut pour moi une vraie révélation et cela je le dois à tous les membres actifs de ces associations, alors merci à vous. Merci à Sébastien, Marie-Gabrielle, ma vieille amie, Jeannot, Laure, Simon, Caroline, Solenn, Ludovic, Jackie, Marion, Pierre, Cécile, Anne-Laure, et tant d'autres. Vous avez été un vrai rayon de soleil dans ma vie de petite doctorante.

Je n'oublie pas mes amis de Dijon. Charlotte, Séverine et Mireille, voilà j'ai accomplie ma mission... Fières ??? Matthieu, je crois que tu avais raison sur bien des points, mais j'apprécie trop le fait d'être toujours en contradiction avec toi. Ma petite Emilie, je te remercie pour tout et surtout pour tes merveilleuses histoires qui me permettent de m'évader dans ce monde de fantasy que j'apprécie tant.

Un merci tout spécial à celui qui a su me redonner confiance en la vie et surtout en moi. Merci d'avoir su mettre un peu de lumière dans ma vie quand les jours étaient trop sombres.

Je vous remercie toutes et tous de m'avoir supporté durant ces années, dans le privé comme dans le travail. Merci pour tout !!!!!

J'ai presque oublié de remercier mes précieuses petites cellules qui ont sacrifié leurs vies pour l'avancée de la science.

Sommaire

Introduction

I/	La mucoviscidose	1
A.	<i>Epidémiologie.</i>	1
B.	<i>Physiopathologie</i>	1
1-	Manifestations respiratoires	2
2-	Manifestations digestives	2
3-	Manifestations hépatiques	2
4-	Autres manifestations	2
5-	Dépistage de la maladie	3
C.	Historique	3
II/	Le canal CFTR	4
A.	<i>Le gène CF</i>	4
B.	<i>Structure de la protéine CFTR</i>	4
1-	La famille des transporteurs ABC	5
2-	Topologie prédite de CFTR	5
C.	<i>Les différents domaines de CFTR</i>	6
3-	Le domaine régulateur R	7
4-	Les domaines transmembranaires et le pore	7
5-	Les domaines de liaison aux nucléotides (NBD)	8
D.	<i>Les différentes classes de mutations</i>	10
1-	Classe I	11
2-	Classe II	13
3-	Classe III	13
4-	Classe IV	14
5-	Classe V	14
6-	Classe VI	14
III/	Fonctions de la protéine CFTR	15
A.	<i>CFTR : canal ionique</i>	15
1-	Les canaux chlorure	15
2-	CFTR	16
3-	CFTR : transporteur d'ATP	18
B.	<i>La régulation de la protéine CFTR</i>	19
C.	CFTR : canal régulateur de canaux ioniques et de transporteurs	21
1-	Les canaux ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel)	21
2-	Les canaux ENaC (Epithelial Sodium Channel)	23
3-	Les canaux ROMK (Renal Outer Medullary Potassium channel)	25
4-	Les aquaporines	26
5-	Les échanges Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻	27
D.	<i>CFTR : protéine d'interactions</i>	28
1-	Interaction avec la partie C-terminale de CFTR	28
2-	Interaction avec la partie N-terminale de CFTR	30
IV/	Biologie cellulaire de la protéine CFTR	31
A.	<i>La protéine CFTR sauvage</i>	31
1-	Généralités sur la biosynthèse de la protéine CFTR	31
2-	Maturation de la protéine CFTR	32
3-	Rôle de l'ATP dans la voie de biosynthèse de la protéine CFTR	35

4-	Le transport intracellulaire de CFTR	35
5-	L'endocytose et le recyclage de CFTR	38
<i>B.</i>	<i>La protéine CFTR-F508del</i>	39
1-	Modifications de la protéine CFTR induites par la mutation F508del.	39
2-	Localisation de la protéine CFTR-F508del	40
3-	Voie de biosynthèse de la protéine CFTR-F508del	41
VI/	Systèmes de dégradation des protéines	43
<i>A.</i>	<i>Dégradation des protéines solubles</i>	43
<i>B.</i>	<i>Dégradation des protéines membranaires</i>	43
1-	Dégradation depuis le RE	43
2-	Dégradation depuis la membrane plasmique	48
3-	Dégradation depuis l'appareil de Golgi	49
VI/	Dégradation des protéines CFTR	50
<i>A.</i>	<i>Rôle des principales protéines chaperonnes dans la biosynthèse de CFTR</i>	50
1-	Rôle des chaperonnes moléculaires	50
2-	Rôle de la calnexine dans la biosynthèse de CFTR	54
<i>B.</i>	<i>Implication de l'ERAD dans la dégradation de CFTR</i>	56
1-	Signal de sortie du cycle de la calnexine	56
2-	Autres protéines chaperonnes impliquées dans le système ERAD	57
<i>C.</i>	<i>La dégradation de la protéine CFTR-F508del</i>	60
1-	La réponse UPR et la protéine CFTR-F508del	60
2-	Influence des chaperonnes du ERQC sur la rétention et la dégradation de la protéine CFTR-F508del	62
<i>D.</i>	<i>Voies impliquées dans la dégradation des protéines CFTR</i>	65
VII/	Les protéines G ou GTPases	67
<i>A.</i>	<i>Les protéines G monomériques</i>	67
<i>B.</i>	<i>Les protéines G hétérotrimériques</i>	68

Contexte Scientifique & Objectifs

I/	Contexte scientifique	72
II/	Objectifs	73

Matériels & Méthodes

I/	Culture cellulaire	75
<i>A.</i>	<i>Lignées cellulaires</i>	75
<i>B.</i>	<i>Conditions de culture</i>	75
<i>C.</i>	<i>Repiquage</i>	75
<i>D.</i>	<i>Congélation</i>	76
II/	Expression des protéines recombinantes	76
<i>A.</i>	<i>Protéines exprimées</i>	76
<i>B.</i>	<i>Transfection transitoire</i>	78
<i>C.</i>	<i>Transfection stable au phosphate de calcium et sélection des clones positifs</i>	78
III/	La cytométrie en flux	79
<i>A.</i>	<i>Principe de l'analyse cytométrique</i>	79
<i>B.</i>	<i>Protocole de l'analyse cytométrique</i>	79
IV/	Détermination des proportions de cellules vivantes, nécrosées ou apoptotiques	80
<i>A.</i>	<i>Proportion de cellules vivantes</i>	80

B.	<i>Proportion de cellules en apoptose</i>	80
C.	<i>Proportion de cellules en nécrose</i>	80
D.	<i>Caractérisation des cellules par microscopie</i>	80
V/	Déplétions en ATP et en GTP	81
A.	<i>Déplétion en ATP</i>	81
B.	<i>Déplétion en GTP</i>	81
VI/	Détermination de la concentration intracellulaire en ATP ([ATP]_i) et en GTP ([GTP]_i)	81
A.	<i>Mesure de la [ATP]_i</i>	82
B.	<i>Mesure de la [GTP]_i par chromatographie</i>	84
C.	<i>Test de l'activité GTPasique</i>	85
VII/	Test de fixation de CFTR sur colonne d'ATP et de GTP	86
VIII/	Perméabilisation et caractérisation cellulaires	87
A.	<i>Procédure de perméabilisation cellulaire</i>	87
B.	<i>Caractérisation de la perméabilisation</i>	87
IX/	Détermination de la demi-vie de la protéine CFTR	88
X/	Extraction protéique	89
A.	<i>Extraction avec le tampon RIPA</i>	89
B.	<i>Extraction avec le tampon Agrégat</i>	89
XI/	Dosage protéique	90
XII/	Détermination du profil glycosidique	91
XIII/	Immunoprécipitation de la protéine CFTR-F508del	91
XIV/	Electrophorèse et immunodétection	91
XV/	Mesure de l'activité du protéasome	92
XVI/	Préparation des fractions enrichies en RE	93
A.	<i>Centrifugation différentielle</i>	93
B.	<i>Fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose</i>	94
C.	<i>Test d'activité enzymatique sur les fractions</i>	95
D.	<i>Traitements des microsomes par le carbonate de calcium (Na₂CO₃) ou l'iodure de potassium (KI)</i>	97
E.	<i>Etude de la dégradation in vitro de CFTR-F508del</i>	97
F.	<i>Spectrométrie de masse</i>	97
XVII/	Protéolyse ménagée	98
XVIII/	Immunolocalisation cellulaire	98
A.	<i>Principe général</i>	98
B.	<i>Protocole d'immunomarquage</i>	99
C.	<i>Microscope à epifluorescence</i>	99
XIX/	Obtention et quantification des ARNm de CFTR	99
A.	<i>Extraction des ARN totaux</i>	99
B.	<i>Transcription inverse des ARNm</i>	100
C.	<i>PCR semi-quantitative</i>	100

Résultats

I/	La protéine CFTR-F508del dans les cellules BHK-21	103
A.	<i>Expression et localisation</i>	103
B.	<i>Dégradation de CFTR-F508del</i>	106
1-	<i>Détermination de la demi-vie de la protéine CFTR-F508del</i>	106
2-	<i>Effet des inhibiteurs du protéasome sur la dégradation de CFTR-F508del</i>	107
3-	<i>Effet des inhibiteurs des lysosomes sur la dégradation de CFTR-F508del</i>	112

4-	Rôle de l'ATP dans la dégradation de CFTR-F508del	113
II/	La protéine CFTR-F508del dans le RE	116
A.	<i>Fraction microsomale (FM) obtenue par centrifugation différentielle</i>	116
1-	Caractérisation de la FM	117
2-	Caractérisation de l'expression de CFTR-F508del dans la FM	121
3-	Dégradation de CFTR-F508del dans la FM	122
4-	Profil d'inhibition de la dégradation de CFTR-F508del dans la FM	123
5-	Rôle des facteurs cytosoliques	125
B.	<i>Fraction microsomale obtenue par fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose</i>	127
1-	Caractérisation enzymatique du fractionnement sur gradient de sucrose	127
2-	Caractérisation de la FRE	128
3-	Dégradation de CFTR-F508del à 37°C et à 26°C	129
III/	Rôle du GTP dans la dégradation de CFTR-F508del	131
A.	<i>Contenu nucléotidique et viabilité cellulaire</i>	131
B.	<i>Effet du MPA sur la dégradation de CFTR-F508del</i>	132
C.	<i>Effet de la déplétion en GTP sur la voie ubiquitine/protéasome</i>	133
D.	<i>Effet du MPA sur l'expression des ARNm de CFTR</i>	134
IV/	Implication de l'AlF4- dans la dégradation de CFTR-F508del	136
A.	<i>Effet de l'AlF4- sur la dégradation de CFTR-F508del</i>	136
1-	Obtention du complexe fluoroaluminate AlF4-	136
2-	Effet de NaF, AlCl ₃ , d'AlF ₃ et d'AlF ₄ - sur la viabilité cellulaire	137
3-	Effet de NaF, de l'AlCl ₃ , de l'AlF ₃ sur la dégradation de CFTR-F508del	138
4-	Effet de l'AlF ₄ - sur l'expression et la dégradation de CFTR-F508del	138
5-	Activité du protéasome et ubiquitination totale	140
B.	<i>Effet de l'AlF4- sur l'interaction de CFTR-F508del avec les chaperonnes</i>	141
C.	<i>Effet de l'AlF4- sur la fixation de l'ATP au niveau des domaines NBDs</i>	142
D.	<i>Effet d'AlF4- sur le trafic intracellulaire</i>	142
V/	Localisation de la dégradation dépendante du GTP de CFTR-F508del	144
A.	<i>Effet de différents inhibiteurs du trafic vésiculaire</i>	144
B.	<i>Dégradation de CFTR-F508del dans les cellules perméabilisées</i>	146
1-	Caractérisation de la perméabilisation	146
2-	Effet de l'AlF ₄ - sur la dégradation de CFTR-F508del	147
C.	<i>Inhibition de la retranslocation de CFTR-F508del</i>	148
VI/	Rôles des protéines associées à la membrane du RE dans la voie de dégradation GTP-dépendante	150
A.	<i>Effet des protéines périphériques du RE sur la dégradation de CFTR-F508del</i>	150
B.	<i>Les protéines périphériques sont porteuses d'une activité GTPasique</i>	152
VII/	La voie GTP-dépendante localisée au niveau du RE n'est pas spécifique	153
VIII/	Identification des protéines GTP-dépendantes	154

Conclusions & Perspectives 157

Références Bibliographiques 168

Annexes

*Données
Bibliographiques*

I/ La mucoviscidose

A. Epidémiologie

La mucoviscidose, ou cystic fibrosis (CF) selon la terminologie anglo-saxonne, est une maladie génétique, autosomale et récessive. Elle résulte de l'altération des transports ioniques au sein des tissus épithéliaux exocrines. Il s'agit de la maladie génétique la plus fréquente dans les populations européenne et nord-américaine avec environ une personne sur 30 porteuse d'un gène muté et un âge moyen de décès de 24 ans pour les personnes atteintes. En 2005, un enfant sur 4600 est atteint de cette maladie à la naissance avec une espérance de vie de 42 ans.

B. Physiopathologie

La mucoviscidose est une maladie polyviscérale qui atteint essentiellement les tissus épithéliaux exocrines (rein, pancréas, intestin, cœur, vase déférent, foie, glandes sudoripares et voies respiratoires) (**Figure H1**). Ceci conduit majoritairement à des insuffisances respiratoires et pancréatiques, à une infertilité masculine, et parfois féminine, et à une modification de la concentration saline de la sueur.

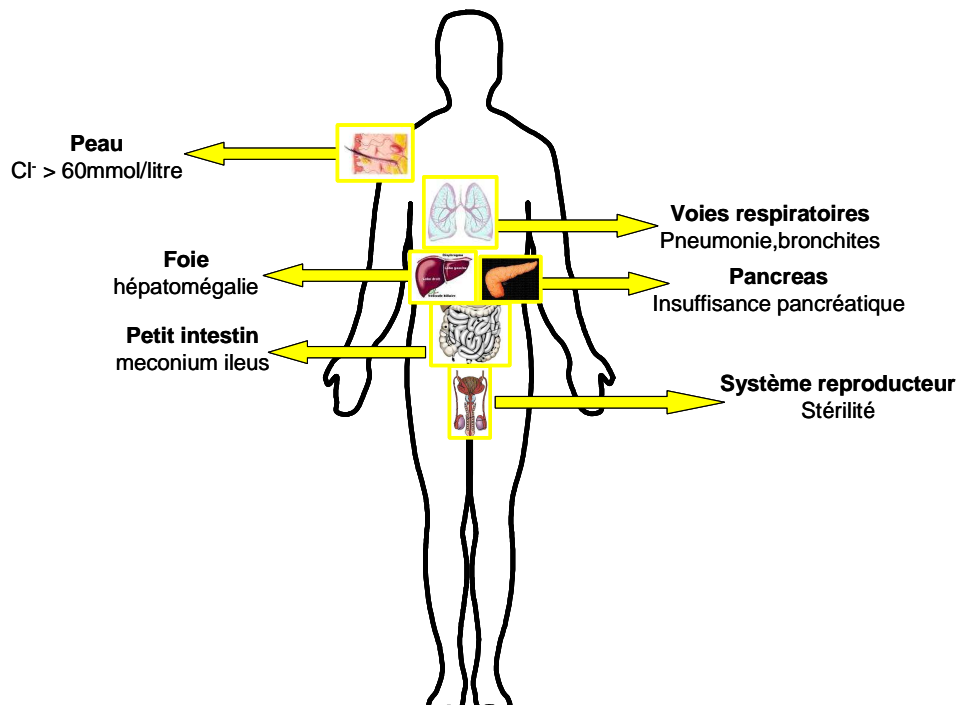


Figure H1: Les dysfonctionnements observés dans la mucoviscidose.

Modifié d'après Ackerman et Clapham, 1997

1- Manifestations respiratoires

Les épithélia CF ne sécrètent pas d'ions chlorure et présentent une absorption accrue d'ions sodium. Ce dérèglement dans le transport d'électrolytes a pour conséquence une augmentation de la viscosité du mucus recouvrant les voies aériennes qui entraîne une occlusion progressive des voies respiratoires, créant ainsi un environnement propice aux infections bactériennes opportunistes. Les affections pulmonaires dues à une colonisation par des bactéries, comme *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et surtout *Pseudomonas aeruginosa* dans les stades tardifs de la maladie, sont la principale cause de mortalité chez les patients (Ratjen et Döring, 2003). Une fois l'infection bactérienne installée il est très difficile, voir impossible, de l'éradiquer. Cette résistance bactérienne aux différents antibiotiques reste de nos jours inexplicée.

2- Manifestations digestives

L'insuffisance pancréatique exocrine (défaut de production des enzymes), observée chez 90% des patients, est l'atteinte digestive majeure. Elle est la conséquence d'un volume réduit de sucs pancréatiques associé à une faible concentration en bicarbonate. Ces manifestations entraînent l'obstruction des canaux excréteurs empêchant la sécrétion des enzymes pancréatiques ce qui a pour effet une maldigestion lipidoprotidique et une malabsorption (Ratjen et Döring, 2003).

3- Manifestations hépatiques

L'atteinte hépatique (hépatomégalie dans 30% des cas et insuffisance hépatique dans 9% des cas) est liée à l'obstruction des voies biliaires intra-hépatiques ou extra-hépatiques par compression au niveau du pancréas. Dans 2 à 5% des cas, ces lésions conduisent à une cirrhose biliaire dans des délais variables.

4- Autres manifestations

L'anomalie des glandes sudoripares conduit à un excès de chlorure de sodium (NaCl) dans la sueur, cette perte de sels pouvant être responsable de déshydratation aiguë en cas d'exposition à la chaleur.

D'autres organes peuvent être touchés, en particulier l'appareil génital : 98% des hommes atteints sont stériles en raison d'une azoospermie obstructive (agénésie des canaux déférents), et 20% des femmes atteintes sont aussi stériles.

5- Dépistage de la maladie

Les circonstances de dépistage de la maladie sont variables avec l'âge. Elle est parfois révélée dès la naissance par un ileus méconial (occlusion intestinale due à un méconium anormalement épais) rencontré chez 10% des nouveaux nés atteints. Chez le nourrisson, le prolapsus rectal est toujours évocateur et justifie le test de dépistage du NaCl dans la sueur. Plus tard, la symptomatologie, peut être plus riche, touche les deux pôles, respiratoire et digestif, et associe des infections respiratoires à répétition avec des signes en rapport avec une malabsorption.

C. Historique

La description de la mucoviscidose en tant qu'affection autonome, date de la fin des années 30. En effet, c'est en 1936 que Fanconi identifie l'association "fibrose kystique congénitale du pancréas et broncheectasies" et, en 1938, qu'Andersen donne la description anatomo-pathologique complète de la mucoviscidose (Andersen, 1938). En 1945, Farber propose le terme *mucoviscidosis* (pour mucus visqueux) et affirme que la maladie est le résultat d'un état anormalement épais du mucus (Farber, 1945). Les travaux d'Andersen apportèrent la première évidence que la maladie est d'origine génétique et autosomale.

En 1953, Di Sant'agnese met en évidence un excès de NaCl dans la sueur des enfants atteints de mucoviscidose (Di Sant'agnese *et al.*, 1953). Cette découverte conduira, peu après, à la mise au point du "test de la sueur". Dans les années 80, l'anomalie du transport de sels fut précisée par Quinton (Quinton, 1983) qui décrivit le défaut de perméabilité aux ions chlorure (Cl⁻) affectant les cellules épithéliales des glandes sudoripares. La même observation a été réalisée au niveau de l'épithélium respiratoire par Knowles (Knowles *et al.*, 1981a,b).

Mais le mécanisme du défaut à l'origine de la maladie est resté longtemps inconnu. En 1985, le locus *CFTR* fut localisé sur le bras long du chromosome 7 grâce à la découverte d'une liaison avec un site polymorphe exploré par une sonde anonyme située sur ce chromosome

(Knowlton *et al.*, 1985). En 1989, le gène *CFTR*, impliqué dans la mucoviscidose, a été isolé par clonage positionnel (Kerem *et al.*, 1989 ; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

II/ Le canal CFTR

A. Le gène CFTR

Le gène *CFTR*, dont les mutations sont responsables de la maladie de la mucoviscidose, est localisé sur le chromosome 7 au locus q31 (Tsui *et al.*, 1985). Il fait 190 kb et contient 27 exons. L'ARNm de 6.5 kb est traduit en une protéine transmembranaire composée de 1480 acides aminés appelée CFTR pour « Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator » (Kerem *et al.*, 1989 ; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989) (**Figure H2**).

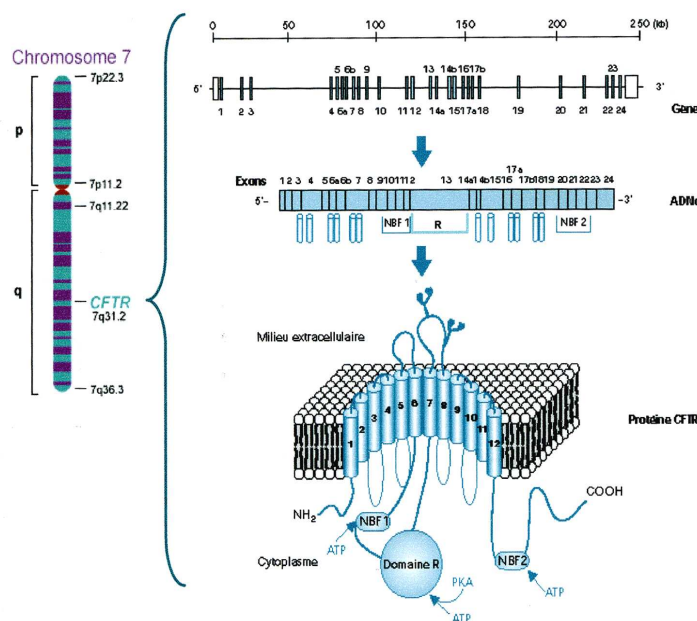


Figure H2: CFTR : de la localisation chromosomique à la localisation membranaire.

B. Structure de la protéine CFTR

CFTR est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Au sein de la superfamille des ABC humains, CFTR appartient à la sous famille des ABCC, où elle porte le nom de ABCC7 (Frelet et Klein, 2006). A ce jour il n'existe pas de structure haute résolution de la protéine CFTR, mais seulement une structure 2D (Rosenberg *et al.*, 2004).

1- La famille des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC sont des protéines ubiquitaires présentes aussi bien chez l'Homme que chez les procaryotes. Ils ont pour fonction de transporter à travers la membrane, grâce à la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, diverses molécules telles que des protéines, des lipides, des sucres, des ions, des antibiotiques ou des drogues... (Higgins et Linton, 2004 ; Gadsby *et al.*, 2006)

Malgré de très nombreuses différences existant entre les membres des transporteurs ABC, plusieurs traits communs, surtout architecturaux sont observés (**Figure H3**). Nous retrouvons, d'une part la présence de domaines de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, appelés NBDs (Nucleotide Binding Domain), et d'autre part la séquence signature LSGGQ (motif C) caractéristique de cette famille. Ces domaines contiennent aussi les séquences consensus de liaison des nucléotides Walker A et Walker B, ainsi que la séquence linker ou motif C dans laquelle se trouve la séquence signature ABC.

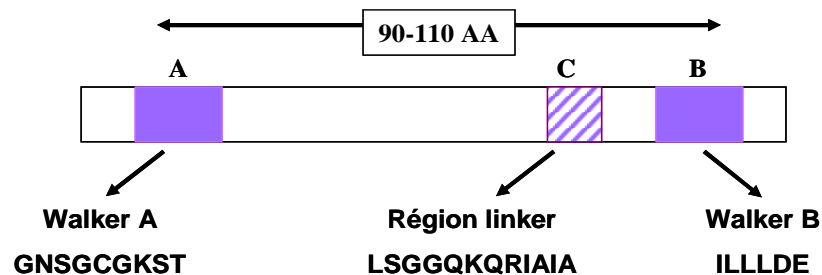


Figure H3: Organisation structurale des transporteurs ABC classiques.

Structure schématique d'une cassette de liaison à l'ATP (NBD). Les domaines hautement conservés Walker A et B sont séparés par 90-110 acides aminés (AA). La séquence signature (motif C) est juste en avant du Walker B. Les séquences consensus sont représentées par la nomenclature mono lettrique des AA.

D'après Gottesman et Ambudkar, 2001

De plus chaque transporteur ABC possède quatre domaines structuraux correspondant aux deux NBDs et aux deux TMDs (TransMembrane Domain) composés de six segments transmembranaires (TM).

2- Topologie prédite de CFTR

L'analyse de la séquence primaire (Riordan *et al.*, 1989) permet de prédire la présence de deux fois six TMs et trois domaines intracellulaires correspondant à deux NBDs, notés NBD1 et NBD2 et à un domaine régulateur (R) (Pedersen, 2005) qui relie les deux domaines TMD-NBD. Le domaine R possède de nombreux sites de phosphorylation par les protéines kinases (PKA et PKC) (Devidas et Guggino, 1997). Il existe également deux sites de N-glycosylation au niveau des asparagines (N) 894 et 900 de la 4^{ème} boucle extracellulaire reliant les segments transmembranaires TM7 et TM8. D'après les profils d'hydrophobicité, 80% des acides aminés se trouvent dans le cytoplasme, 16% dans les segments transmembranaires et 4% dans les boucles extracellulaires. Les domaines N- et C-terminaux de la protéine sont cytoplasmiques (**Figure H4**) (Akabas *et al.*, 1997).

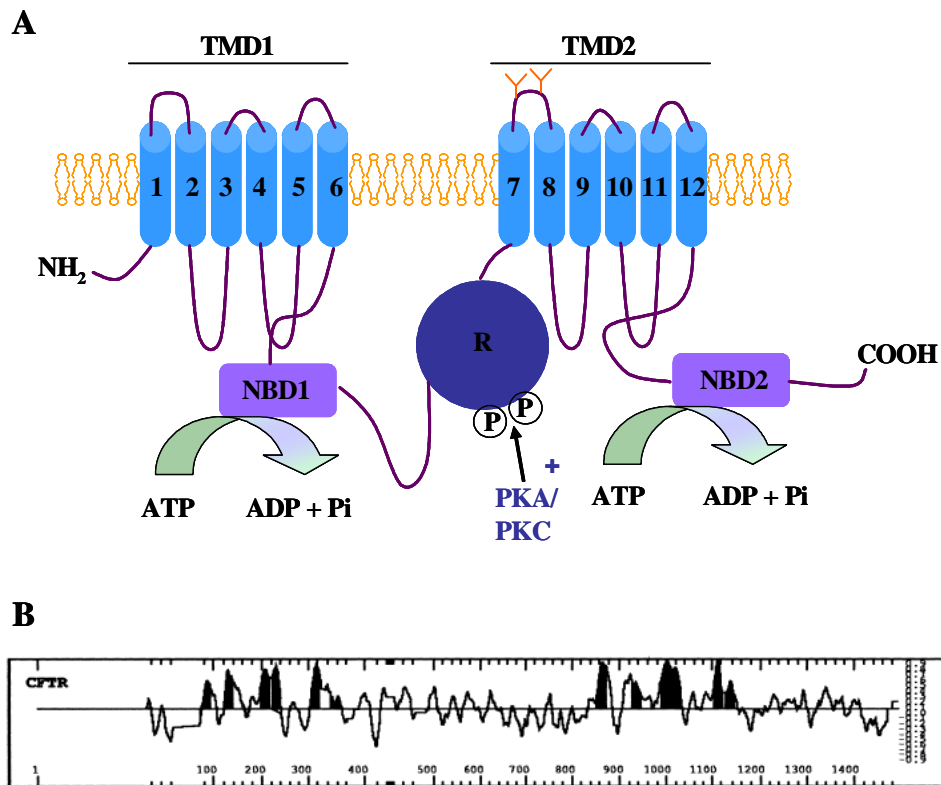


Figure H4: Structure prédite de la protéine CFTR (A) établie d'après son profil d'hydrophobicité (B).

TMD1 et TMD2 : « *Transmembrane Domain 1* » (hélices α 1 à 6) et « *Transmembrane Domain 2* » (hélices α 7 à 12).

NBD1 et NBD2 : « *Nucleotide Binding Domain* », domaine de fixation et d'hydrolyse de l'ATP.

R : « *Regulatory Domain* », domaine régulateur

P : acides aminés phosphorylés

PKA/PKC : protéines kinases A et C

D'après Klein et al., 1999

C. Les différents domaines de CFTR

Comme toutes les protéines ABC, CFTR est composée de quatre domaines (deux TMDs et deux NBDs), auxquels s'ajoute un domaine régulateur R. D'une manière générale, l'importance des différents domaines pour la fonction de CFTR a été établie. La connaissance des interactions entre les différents domaines de CFTR est essentielle pour la compréhension de la maturation, de la régulation et de la fonction du canal CFTR. Bien qu'il existe, à l'heure actuelle, peu de données sur la structure quaternaire de CFTR, les différents domaines de ce canal, ainsi que leur fonction, ont été étudiés.

1- Le domaine régulateur R

Ce domaine correspond aux résidus 590 à 831 codés par l'exon 13. Il est spécifique du canal CFTR. Le domaine R contient huit des dix sites classiques de phosphorylation par la PKA, phénomène nécessaire à l'ouverture du canal par le MgATP (Berger *et al.*, 1991). La phosphorylation du domaine R par la PKA augmente de 100 fois l'activité du canal alors que la phosphorylation par la PKC n'augmente que modestement cette activation. Cette dernière pourrait potentialiser ou être un pré-requis à la phosphorylation par la PKA (Tabcharani et Riordan, 1991). L'état déphosphorylé du domaine R maintient le canal fermé, alors que des modifications de conformation interviennent dans le passage à l'état ouvert (Cotten et Welsh, 1997) (**Figure H5**).

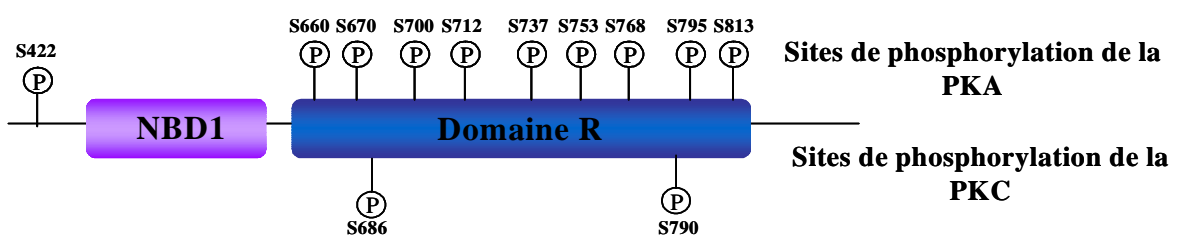


Figure H5: Représentation schématique des sites de phosphorylation de la protéine CFTR par les PKA et les PKC.

NBD1 : Nucleotide Binding Domain 1

PKA : Protéine Kinase A ; PKC : Protéine Kinase C

P : sites de phosphorylation

S : Sérine

D'après Gadsby et al., 1999

Le domaine R est composé de deux sous-domaines :

- ④ **RD1** (résidus 590 à 672) est très conservé dans les différentes espèces, et est impliqué dans la maturation de la protéine ainsi que dans l'ouverture du canal en modulant des interactions dynamiques entre le domaine NBD1 et les sites de phosphorylation du domaine R (Pasyk *et al.*, 1998).
- ④ **RD2** (résidus 672 à 831), à l'inverse, est très variable entre les espèces (Dulhanty et Riordan, 1994). Il contient les résidus serines phosphorylables qui lui confèrent un rôle important dans le fonctionnement du canal CFTR.

2- Les domaines transmembranaires et le pore

Récemment une structure 2D basse résolution de CFTR a été obtenue (Rosenberg *et al.*, 2004), mais elle ne permet pas d'identifier les segments bordant le canal. Cependant, par analogie avec les autres canaux ioniques, il est logique que les domaines transmembranaires TMD1 et TMD2 interviennent dans la formation du pore (Anderson *et al.*, 1991). C'est à ce niveau que les ions passent à travers la membrane avec une sélectivité qui suit la séquence $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$.

Anderson, en 1991, a muté quatre des six acides aminés chargés positivement présents au niveau des segments transmembranaires : K95 (situé dans TM1), K334 (situé dans TM6), R347 (situé dans TM6) et R1030 (situé dans TM10) (**Figure H6**). Il ressort de cette étude que TMD1 joue un rôle important dans la conductance et dans la sélectivité des ions. Plus particulièrement, TM1 et TM6 possèdent une structure secondaire essentiellement formée d'une hélice α dont une des faces est exposée à la lumière du canal (Akabas *et al.*, 1994 ; Cheung *et al.*, 1996).

De plus, des changements de conformation du segment TM6 (passage d'une hélice α à un feuillet β) influent sur la sélectivité et l'ouverture du canal (Wigley *et al.*, 1998). Des études récentes ont mis en avant le rôle des chaînes latérales chargées positivement des acides aminés R334 et K95 dans le transport rapide des ions chlorure à travers le canal. Par mutagenèse dirigée, il a été possible de corrélérer les charges positives de ces deux acides aminés avec le transport des ions chlorure. Le R334 du TM6 attire le Cl^- du milieu extracellulaire vers le pore alors que la K95 du TM1 pousse le Cl^- du côté intracellulaire de la membrane (Smith *et al.*, 2001 ; Linsdell, 2005). La liaison des ions est la clé entre la sélectivité ionique et la rapidité du transport à travers le pore (Zhou et MacKinnon, 2003). L'utilisation d'anion pseudohalilé tels que $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ a permis d'identifier K95, R334 et T338

3- Les domaines de liaison aux nucléotides (NBD)

Dans la séquence des NBDs se trouvent les sites consensus de liaison à l'ATP, Walker A et B (Walker *et al.*, 1982), ainsi que le motif C, séquence commune à tous les transporteurs ABC. Ce dernier est situé à la surface des domaines NBDs, proche des sites de liaison de l'ATP (Clancy *et al.*, 1997) (**Figure H3 et Tableau HI**). La lysine du Walker A interagit avec le phosphate α ou γ de l'ATP et est essentielle à l'hydrolyse. L'acide aspartique du Walker B est sensible aux ions magnésium (Mg^{2+}) et est nécessaire à la liaison de l'ATP. La glycine du motif C jouerait, quant à elle, un rôle important dans l'hydrolyse du GTP (Sheppard et Welsh, 1999).

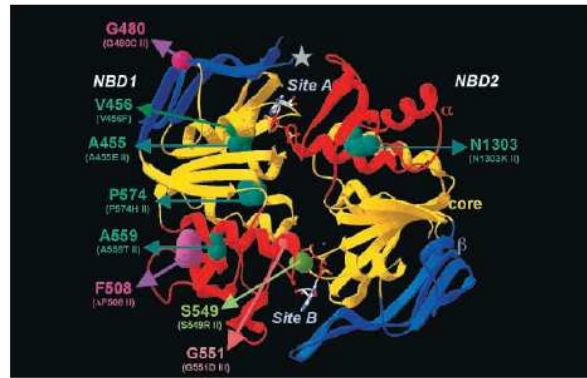
Tableau HI: Motifs conservés à l'intérieur des domaines de liaison aux nucléotides.

Motif	Séquence	Position
Walker A	GXXGKGKS/T	
NBD1	GSTGAGKT	465
NBD2	GRTGSGKS	1251
Motif C	LSGGQ	
NBD1	LSGGQ	552
NBD2	LSHGH	1350
Walker B	RXhhhhD	
NBD1	RXLYLLD	572
NBD2	RXILLLD	1370

Les séquences consensus Walker A, motif C et Walker B appartiennent au CFTR humain. X se rapporte à n'importe quel acide aminé et h à un acide aminé hydrophobe.

La structure secondaire des NBDs (**Figure H7 A**) consiste essentiellement en un feuillet β (60-70%) central entouré par des hélices α (10%). Selon les auteurs, les limites des domaines NBD1 et NBD2 varient beaucoup. Pour NBD1, la limite inférieure varie du résidu D373 (codé par l'exon 9) à F433, et la limite supérieure est comprise entre I586 (codé par l'exon 12) et G673. Le domaine NBD2 est formé des résidus L1127 à Q1382 (Riordan *et al.*, 1989 ; Chan *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2002 ; Lewis *et al.*, 2004 ; Bianchet *et al.*, 1997). Les deux domaines NBDs coopèrent dans la régulation des mécanismes d'ouverture et de fermeture ATP-dépendants du canal CFTR. Il a été proposé que l'ATP et le GTP se lient sur le même site (Randak *et al.*, 1996). NBD2 pourrait se comporter comme une sous-unité liant le GTP et a été comparé aux sous-unités α des protéines G hétérotrimériques.

A



B

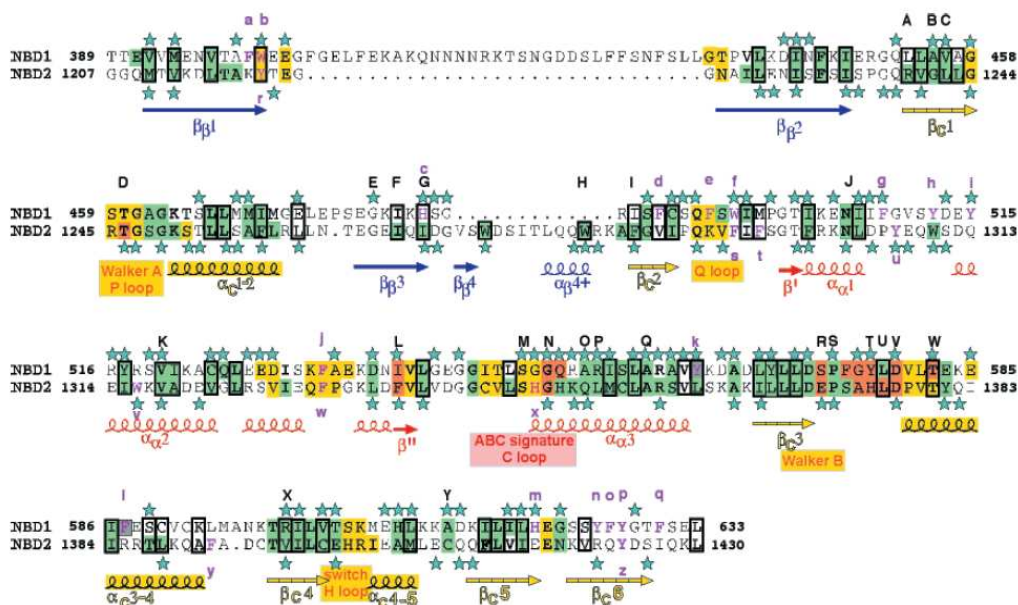


Figure H7: Structure secondaire des NBDs de CFTR.

A: Représentation de l'hétérodimère formé par les NBDs de CFTR, montrant les sites de fixation des nucléotides (site A et site B), ainsi que la localisation de mutations impliquées dans la mucoviscidose.

B: Alignement de séquences des deux NBDs humains de CFTR. Les structures secondaires sont indiquées sous l'alignement.

D'après Eudes et al., 2005

L'organisation des NBDs en core catalytique est semblable à l'ATPase F1. Les feuillettes β recouvrent le site de liaison aux nucléotides et contiennent des acides aminés aromatiques permettant la liaison à l'ATP (**Figure H7 A**). Le sous-domaine composé par les hélices α , incluant le motif C, joue un rôle dans la transduction intramolécule du signal tout en médiant l'interaction avec les TMDs. L'hétérodimère formé par les NBDs, arrangés tête-bêche, permet ainsi le maintien de l'ATP entre les deux sous-unités. Chaque site de liaison est composé du Walker A, du Walker B, de la boucle Q du motif switch (signature des NTPase à la boucle P) d'une sous-unité et du motif C de l'autre sous-unité (**Figure H7 B**) (Eudes *et al.*,

2005). Un tel arrangement est en accord avec le modèle de liaison à l'ATP des transporteurs ABC dans lequel la liaison et l'hydrolyse de l'ATP induisent la formation et la dissociation de l'hétérodimère formé par les NBDs, provoquant ainsi un changement conformationnel du TMD1 *via* son interaction avec le NBD1 (Lewis *et al.*, 2004).

Toutefois, il existe une asymétrie entre les deux sites, nécessaire à une activité catalytique optimale. Ce fonctionnement asymétrique des sites de liaison à l'ATP permet de différencier les deux NBDs (Kidd *et al.*, 2004). Le site A, constitué en grande partie par le NBD1, est un site non canonique puisqu'il n'est pas constitué de tous les acides aminés nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP, et le site B, quant à lui, constitué en partie par le NBD2, correspond au site canonique de l'hydrolyse de l'ATP (**Figure H7 A, B**). Cette observation a permis d'avancer l'hypothèse que l'ATP serait hydrolysé rapidement au niveau du NBD2, alors que l'ATP non hydrolysé resterait lié au niveau du NBD1 pour un temps plus long, permettant ainsi l'ouverture du canal (Aleksandrov *et al.*, 2002 ; Basso *et al.*, 2003).

D. Les différentes classes de mutations

A l'heure actuelle, 1546 mutations ont été identifiées sur le gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium : <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>). La majorité des défauts moléculaires du gène *CFTR* sont des mutations ponctuelles réparties comme suit: 42% de mutations faux-sens, 16% de microinsertions et microdélétions entraînant un décalage de la phase de lecture, 9% de mutations non-sens, 13% de mutations d'épissage et 2% de délétions d'un acide aminé. Il a été également observé quelques grands réarrangements (2%). La fréquence de certaines mutations varie énormément d'un groupe géographique à l'autre. Ces mutations induisent soit des dysfonctionnements soit un défaut de localisation de la protéine CFTR. Elles affectent tous les domaines de la protéine, avec toutefois une forte concentration de mutations graves au niveau du domaine NBD1.

Aujourd'hui, l'ensemble des mutations identifiées au niveau du gène *CFTR* peuvent être réparties en six classes, basées sur le mécanisme responsable de l'activité réduite du canal CFTR. La **figure H8** représente ces différentes classes de mutations et leurs conséquences sur la synthèse, le trafic, la régulation et l'activité de la protéine CFTR.

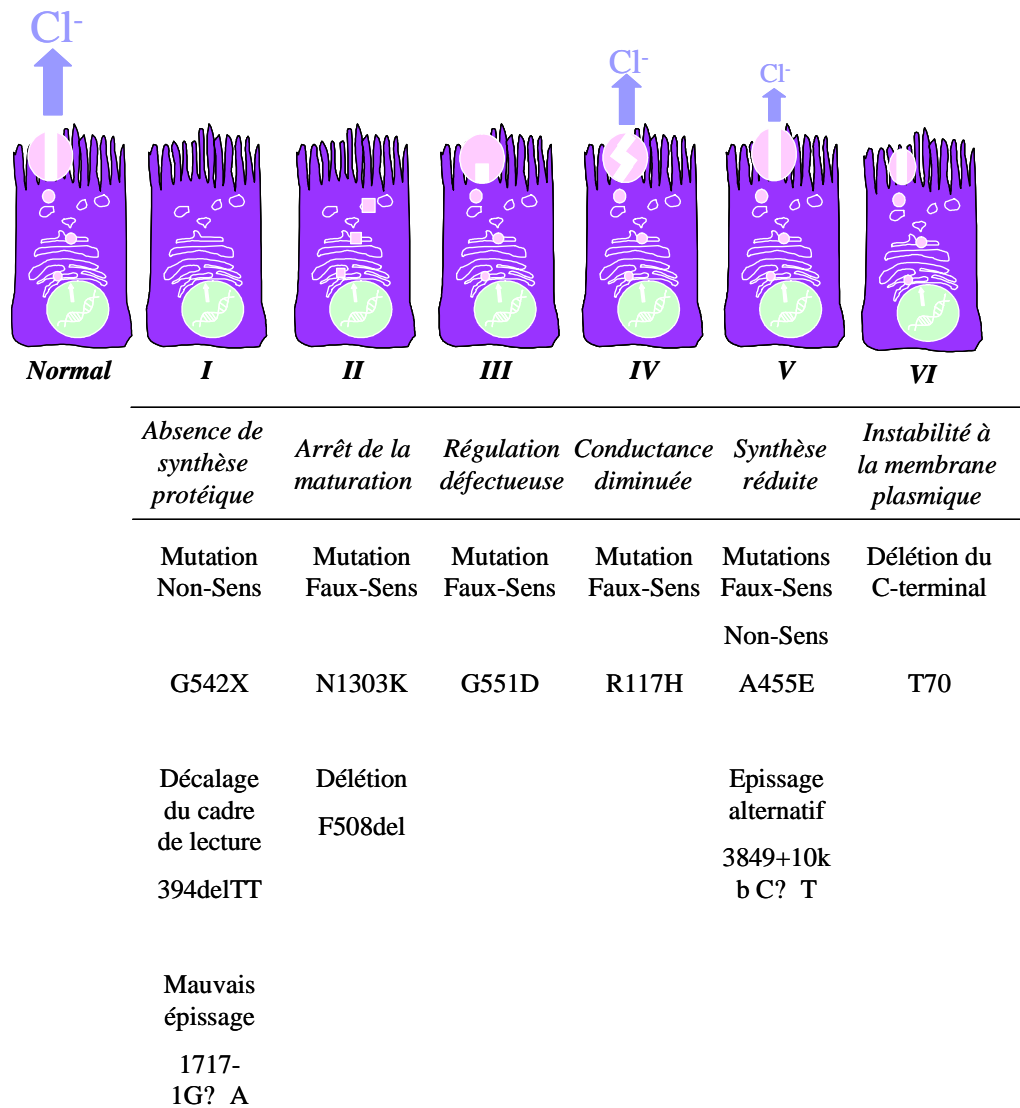


Figure H8: Classification des mutations en fonction des altérations moléculaires.

1- Classe I

Les mutants de classe I sont caractérisés par une absence de la protéine au niveau de la membrane apicale. Un épissage anormal ou l'insertion prématurée d'un codon stop entraîne la synthèse d'un ARNm tronqué instable, qui de ce fait ne peut pas être traduit en protéine. Les mutations non-sens réduisent les niveaux d'expression des ARNm de 95% par rapport au niveau d'expression normal (Hamosh *et al.*, 1992). Ces mutations génèrent un phénotype sévère tel que l'insuffisance pancréatique, et sont souvent associées à une dégénérescence des poumons.

2- Classe II

Les mutants de classe II ont une traduction normale, mais produisent une protéine dont le repliement (ou folding) est anormal. Cette dernière ne passe pas le système de contrôle

qualité localisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE), et de ce fait est séquestrée puis dégradée (Cheng *et al.*, 1990 ; Ward et Kopito, 1994). La délétion d'une phénylalanine en position 508, notée F508del, représente 70% des mutations observées dans la population mucoviscidose. Cette mutation sera amplement décrite dans la section **IV/B** de l'introduction.

3- Classe III

Les mutants de classe III sont caractérisés par la présence du canal CFTR à la membrane mais ce dernier possède une régulation défectueuse. Ces mutants sont associés à des insuffisances pancréatiques et des phénotypes sévères. Cette classe inclut les mutations faux-sens, telles que les mutations G551D et G1244E qui peuvent interférer avec la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'avec la phosphorylation du domaine R (Serre *et al.*, 1993).

4- Classe IV

Les mutations de classe IV (par exemple R117H, G314E et R334W), contrairement à celles de classe III, n'altèrent en rien la phosphorylation ou la fixation de l'ATP, mais montrent un défaut de conductance des ions Cl⁻ ainsi que des caractéristiques cinétiques anormales (Sheppard *et al.*, 1993).

5- Classe V

Les mutations de classe V peuvent être des mutations d'épissage, non-sens ou faux-sens, produisant un ARNm instable. Le canal présent à la membrane est fonctionnel mais en nombre restreint. Ces mutants sont associés le plus souvent à un phénotype pancréatique normal et ne sont pas toujours responsables d'un phénotype mucoviscidose classique.

6- Classe VI

Les mutations de classe VI provoquent, à la membrane plasmique, l'instabilité de la protéine CFTR alors que sa biosynthèse, son trafic et sa fonction ne semblent pas être altérés. Cette mutation correspond à la délétion d'acides aminés (AA) au niveau de la partie C-terminale de CFTR (Haardt *et al.*, 1999).

III/ Fonctions de la protéine CFTR

A. CFTR : canal ionique

1- Les canaux chlorure

Le tissu épithélial forme une barrière continue entre deux compartiments. Ce tissu est composé de cellules épithéliales polarisées (formation d'une couche de cellules) avec un domaine apical en vis-à-vis du compartiment muqueux (lumière) et un domaine basolatéral qui repose sur une lame basale. Compte tenu de l'étanchéité des épithélia, assurée par la présence d'abondantes jonctions serrées, les échanges trans-épithéliaux sont réalisés par les canaux ioniques, les transporteurs et les échangeurs situés aux membranes basolatérales et apicales. Les épithélia peuvent être classés selon la direction du flux ionique qui les traverse. Dans un épithélium sécréteur, l'absorption de Na^+ et la sécrétion de Cl^- sont les éléments majeurs de la fonction épithéliale. Dans ce type d'épithélium, le flux se fait du pôle basolatéral vers la lumière. La pompe Na^+/K^+ -ATPase produit la force motrice nécessaire au transport secondaire actif d'ions Cl^- . Les ions Cl^- entrent dans la cellule à travers la membrane basolatérale, par des co-transporteurs de type $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ et sortent du côté apical par diffusion passive à travers les canaux chlorure (**Figure H9**).

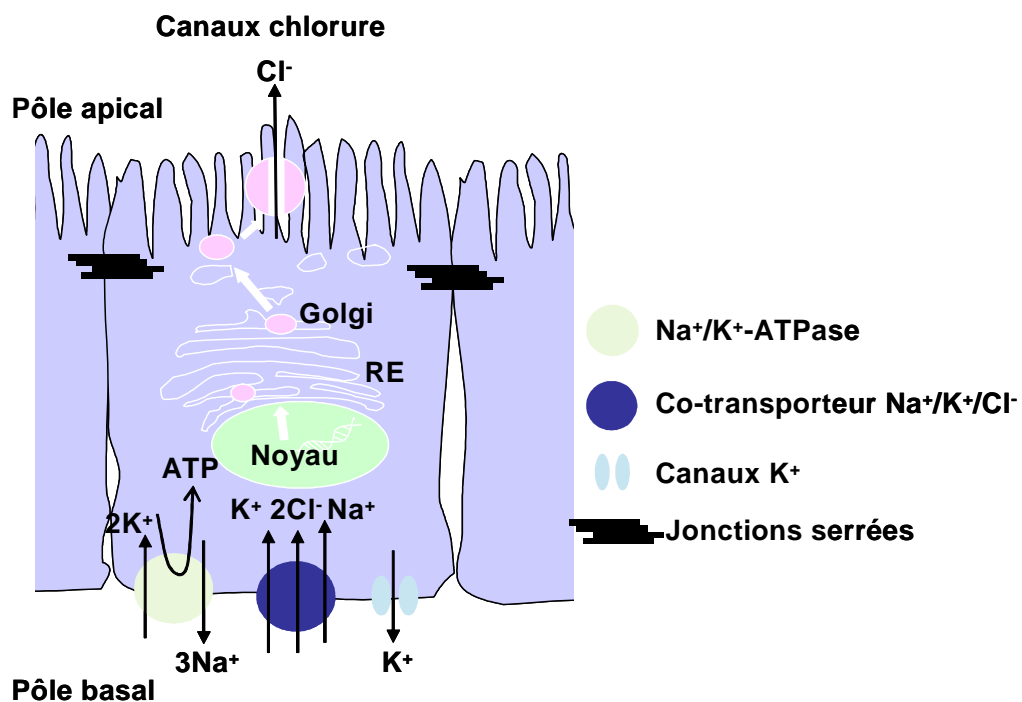


Figure H9: Représentation schématique du transport des ions Cl^- dans une cellule épithéliale d'un épithélium sécréteur.

Modifié d'après McCann et Welsh, 1990

Les canaux chlorure sont présents dans la membrane de la plupart des cellules eucaryotes et jouent un rôle important dans l'excitabilité membranaire, la régulation du volume cellulaire, le transport transépithélial et la régulation du pH intracellulaire. Leur structure moléculaire est encore assez mal connue. L'importance des conductances chlorure dans la physiologie cellulaire s'est révélée avec l'étude des mécanismes de couplage stimulation-sécrétion des cellules exocrines (Petersen et Philpott, 1980). Cet intérêt a été confirmé par l'observation de pathologies associées à des dysfonctionnements de canaux chlorure dans des maladies telles la mucoviscidose (Smith et Welsh, 1993) et la myotonie de Becker (Rüdel et Lehmann-Horn, 1985).

Sur un plan structural, nous pouvons distinguer trois principales classes de canaux chlorure (Figure H10) :

- ④ Le canal chlorure CFTR est localisé au niveau de la membrane apicale de plusieurs épithélia tels que l'intestin, les glandes salivaires, les canaux du pancréas, les voies respiratoires (Crawford *et al.*, 1991 ; Denning *et al.*, 1992).
- ④ Les récepteurs canaux, activés par des ligands. Cela inclus les récepteurs GABA_A et glycine, clonés en 1987. Ces canaux s'assemblent en hétéropentamères, chaque monomère possédant quatre segments transmembranaires (Schofield *et al.*, 1987).
- ④ La famille des canaux CLC : la topologie exacte de ces canaux n'est pas encore connue, ils possèdent environ douze segments transmembranaires, fonctionnent sous forme multimérique et sont exprimés de manière ubiquitaire dans l'organisme.

Les canaux chlorure peuvent également être classés en fonction de leur conductance unitaire. Nous distinguons ainsi les canaux chlorure de conductance élevée : entre 200 et 500 pS (canaux Cl⁻ maxi), les canaux rectifiants sortants et les canaux de faible conductance, généralement inférieure à 20 pS (Becq *et al.*, 1992). Ces canaux sont localisés au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales où ils participent à la sécrétion des ions Cl⁻.

2- CFTR

Dans les cellules épithéliales, le transport des ions Cl⁻ régulé par l'AMPc est lié principalement au canal CFTR (Morris et Frizzell, 1994).

CFTR forme un canal anionique permettant la diffusion passive des ions Cl⁻. La portion extracellulaire du canal ne présente pas de sélectivité anionique (Dawson *et al.*, 1999)

et le site précis ainsi que le mécanisme de sélectivité de charge semblent liées aux acides aminés chargés positivement situés dans les segments transmembranaires TM1 et TM6 (Smith *et al.*, 2001 ; Linsdell, 2005, Cheung et Akabas, 1996, Akabas, 2000).

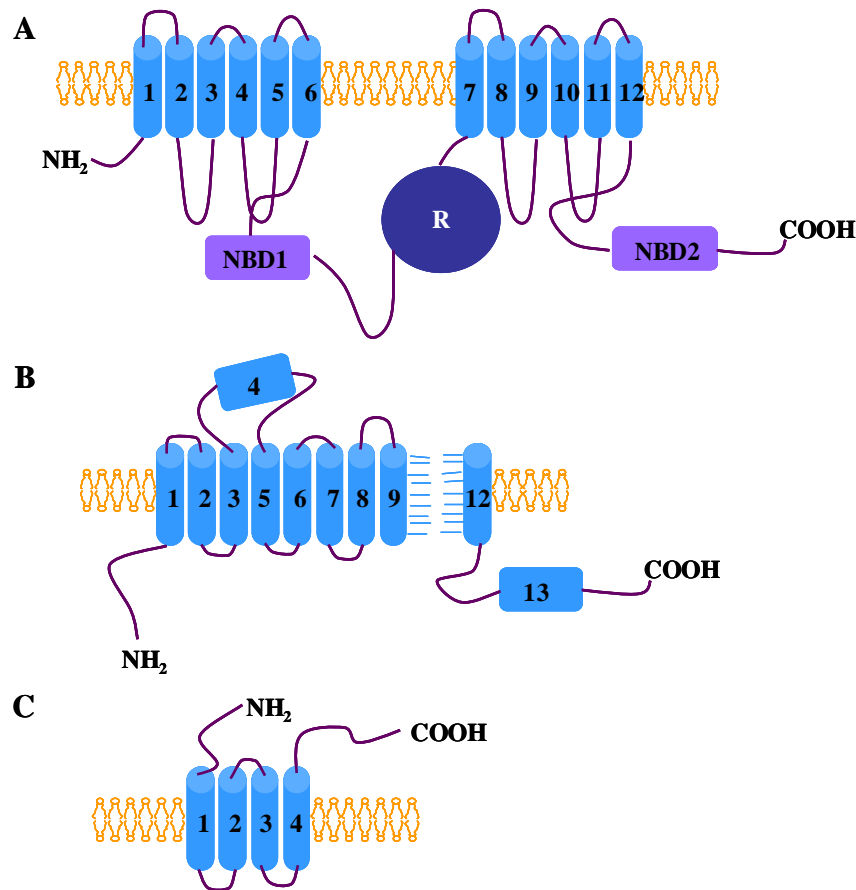


Figure H10: Représentation schématique des familles structurales de canaux chlorure :

A: Canal CFTR.

B: Canaux CLC.

C: Canaux Cl⁻ activés par des ligands (récepteurs GABA et Glycine).

Modifié d'après Nilius et Droogmans, 2003

CFTR est hautement sélectif pour les anions, plutôt que pour les cations monovalents, bien que cette sélectivité soit imparfaite : le Cl⁻ est 10 à 20 fois plus perméant que le Na⁺ (Anderson *et al.*, 1991b ; Bear *et al.*, 1991). Les ions qui sont facilement déshydratés tendent à être plus perméants que les ions qui retiennent plus fortement l'eau. La conductance du canal varie entre 7 et 10pS en fonction du type cellulaire, de la température et de la concentration des ions (**Tableau HII**).

Tableau III: Caractéristiques du canal CFTR.

Conductance unitaire (g)	Sélectivité anion/cation	Relation I/V	Activateurs	Sélectivité ionique
7-10pS	10 :1 canal chlorure	linéaire	PKA, AMPc, PKC	Br ⁻ > Cl ⁻ > I > F ⁻ .

D'après Edelman et Fanen, 2000

Les boucles intracytoplasmiques qui relient les segments transmembranaires impliqués dans la formation du pore, ne participent pas directement aux mouvements des ions. À l'inverse, les résidus de la première boucle extracellulaire, influencent la sélectivité du canal (Seibert *et al.*, 1997). La séquence de perméabilité du canal CFTR est : Br⁻ > Cl⁻ > I > F⁻. Cette séquence distingue CFTR des autres canaux chlorure épithéliaux, dans lesquels la perméabilité de l'ion iodure est plus importante que celle de l'ion chlorure (Sheppard et Welsh, 1999). Cependant, dans les domaines transmembranaires, la mutation de résidus basiques en résidus acides, modifie la séquence de perméabilité, transformant CFTR d'un canal de faible, en un canal de forte perméabilité à l'iode, avec une nouvelle séquence : I > Br⁻ > Cl⁻ > F⁻. Les recherches menées par Linsdell *et al.*, montrent que des ions différents peuvent passer simultanément à travers le pore (Linsdell *et al.*, 1997a). Le résidu R347, situé dans le TM5, sert vraisemblablement de filtre de sélectivité anionique. Il intervient dans le transport multi-anionique en formant des interactions de charge (Tabcharani *et al.*, 1993; Wigley *et al.*, 1998).

3- CFTR : transporteur d'ATP

Certaines équipes pensent que CFTR peut transporter l'ATP (Reisin *et al.*, 1994). Or la partie du pore la plus resserrée a un diamètre d'environ 5,3 Å (Hanrahan *et al.*, 1998), et la molécule d'ATP a une taille de 10,5Å ; il est donc impossible que CFTR soit elle-même le transporteur d'ATP à travers la membrane. C'est ce qu'ont démontré les travaux de plusieurs équipes (Li *et al.*, 1996 b ; Reddy *et al.*, 1996 ; Sugita *et al.*, 1998). En effet, Ils ont montré, en utilisant la technique du patch-clamp, que les courants ATP et Cl⁻ étaient conduits par des canaux distincts, la régulation du transport d'ATP par CFTR étant alors indirecte. La protéine CFTR stimulée par la PKA active l'externalisation de l'ATP, ce qui augmente sa concentration extracellulaire et conduit à l'activation de l'ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) *via* un récepteur purinergique P2R (Schwiebert *et al.*, 1995). Ceci se passe de façon directe ou *via* l'association d'une protéine G ADP-ribosylée à ORCC. L'ATP, en se

fixant sur le récepteur β -adrénergique, déclenche une cascade de signalisation *via* les protéines G et active ORCC (Ismailov *et al.*, 1996). L'ATP extracellulaire permet également la régulation des canaux chlorure-calcium dépendants (Cl_{Ca}). Cependant, pour d'autres auteurs, CFTR n'est pas impliquée dans ce mécanisme de sécrétion d'ATP. Par différentes techniques, ils montrent que ce sont des stimulations mécaniques des surfaces cellulaires qui sont responsables de la sortie d'ATP puisque aucune différence n'est observée entre les cellules mucoviscidosiques et normales (Watt *et al.*, 1998). De plus, le canal CFTR activé ne génère pas de sécrétion d'ATP suffisante pour activer les récepteurs purinergiques (Marcet *et al.*, 2003).

B. La régulation de la protéine CFTR

Pour des températures physiologiques (37°C), la durée d'ouverture du canal CFTR est comprise entre 100 et 250 ms. Les mécanismes qui contrôlent l'ouverture et la fermeture sont des événements séquentiels, impliquant des étapes de phosphorylation suivies de la liaison et de l'hydrolyse du MgATP (**Figure H11**). L'un des modèles le plus apprécié, sur lequel les études structure-fonction s'appuient, propose que des changements de conformation du domaine R, après phosphorylation, permettent le passage des ions chlorure. La levée de l'inhibition imposée par l'état déphosphorylé du domaine R stimule l'interaction entre l'ATP et les domaines NBDs (Gadsby *et al.*, 2006).

La première étape de l'activation du canal passe par une phosphorylation par les PKA stimulée par l'AMPC. Le niveau d'AMPC est contrôlé par la balance entre sa synthèse par les adénylate-cyclases et son hydrolyse par les phosphodiésterases (Kelley *et al.*, 1995). Le degré de phosphorylation du domaine R détermine la probabilité d'ouverture. Bien que les résidus phosphorylables du domaine R (**Figure H5**) soient connus, les résidus impliqués dans les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal sont incertains (Hwang *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 1994). *In vitro* (canal isolé), neuf résidus serines sont phosphorylés par la PKA, situés dans le domaine R : 660, 670, 700, 712, 737, 753, 768, 795, et 813. Les cinétiques de phosphorylation sont influencées par la structure locale de la protéine CFTR, ainsi que par la proximité et l'activité sélective des phosphatases endogènes de la cellule. La phosphorylation du canal CFTR par les PKC semble stimuler une phosphorylation ultérieure par la PKA (Yurko-mauro *et al.*, 1998). Ces données suggèrent qu'une phosphorylation de base par les PKA et les PKC est nécessaire pour entraîner l'activation du canal, en agissant sur des sites de phosphorylation essentiels. Après phosphorylation par les PKA, la déphosphorylation par des

protéines phosphatases inactive le canal (Becq *et al.*, 1993). A l'inverse, l'inhibition des protéines phosphatases endogènes augmente l'efficacité de stimulation du canal CFTR et ralentit son retour à l'état désactivé.

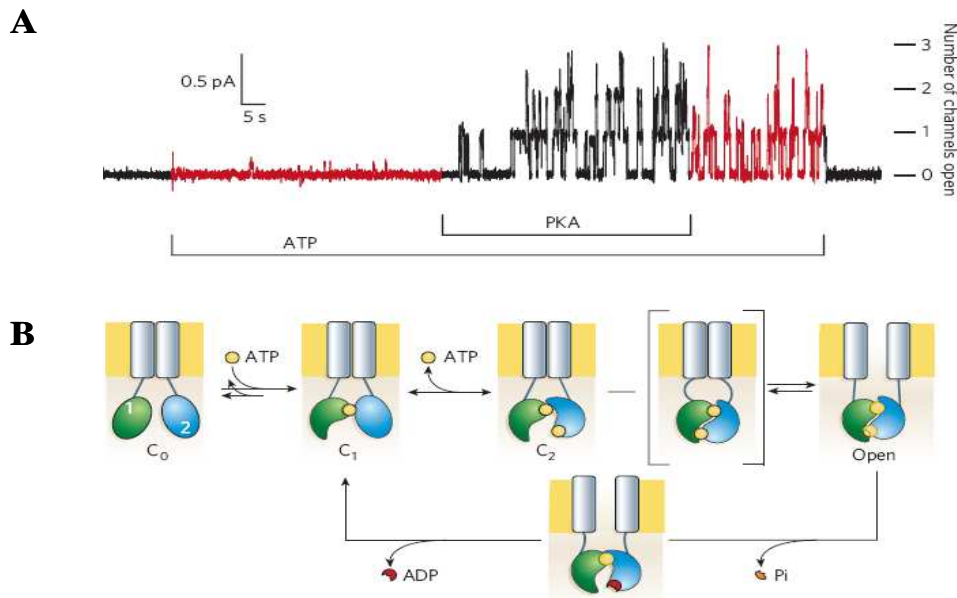


Figure H11: Ouverture et fermeture du canal CFTR.

A: Le domaine R de CFTR doit être phosphorylé par la PKA avant que l'ATP puisse ouvrir le canal. L'enregistrement montre une conductance aux ions chlorure à travers un canal individuel au moment de l'ouverture. Des phosphatases endogènes déphosphorylent partiellement le domaine R, réduisant la probabilité d'ouverture ; mais des canaux restent ouverts tant que l'ATP est présent comme l'indique la droite de la trace.

B: Rôle de l'ATP dans l'ouverture du canal CFTR phosphorylé. Le domaine R est omis. L'ATP (jaune) reste étroitement lié aux motifs Walker de NBD1 (vert) pendant plusieurs minutes, pendant lesquelles de nombreux cycles d'ouverture-fermeture du canal ont lieu. La liaison de l'ATP au NBD2 (bleu) est suivie par une courte ouverture du canal (C₂ à open) qui se produit suite à un état de transition, pendant lequel l'hétérodimère intramoléculaire NBD1-NBD2 est formé mais le pore transmembranaire (rectangles gris) n'est pas encore ouvert. L'état ouvert devient instable par l'hydrolyse de l'ATP lié au NBD2 et la perte du produit d'hydrolyse Pi, ce qui provoque la rupture du dimère puis la fermeture du canal CFTR.

D'après Gadsby et al., 2006

La deuxième étape consiste en la liaison et l'hydrolyse de l'ATP sur les sites NBDs. Elle entraîne une modification conformationnelle des domaines transmembranaires du canal. L'hydrolyse de l'ATP représente l'étape limitante à la fois pour l'ouverture et la fermeture du canal (Gadsby et Nairn, 1999; Foskett, 1998). Dans des expériences de protéine de fusion, les activités ATPasiques ont été localisées sur les résidus 433-589 pour le domaine NBD1, et 1208-1399 pour le domaine NBD2 (Seibert *et al.*, 1997; Mathews *et al.*, 1998).

C. CFTR : canal régulateur de canaux ioniques et de transporteurs

Le nom « régulateur transmembranaire de conductance » donné à la protéine codée par le gène *CFTR* était basé sur le classement de nombreuses anomalies au sein des épithélia mucoviscidosiques, incluant une régulation altérée d'autres canaux chlorure tel que l'ORCC (Hawng *et al.*, 1998 ; Egan *et al.*, 1992 ; Gabriel *et al.*, 1993) ou encore une hyperabsorption des ions sodium par le canal Na⁺ sensible à l'amiloride (Knowles *et al.*, 1981 ; Quinton *et al.*, 1983 ; Boucher *et al.*, 1986 ; Stutts *et al.*, 1995). La perte de l'activité chlorure qui pourrait être impliquée dans le transport transépithélial de l'eau et des ions (Quinton, 1983, Anderson *et al.*, 1991, Bear *et al.*, 1991) n'étant pas suffisante pour expliquer les dysfonctionnements observés, l'hypothèse d'une fonction régulatrice a donc été émise. Ces modèles de régulation par CFTR sont surtout basés sur l'appartenance de CFTR à la superfamille des ABC et sa capacité à fixer des protéines contenant des domaines PDZ (voir paragraphe III/D) (Short *et al.*, 1998). La **figure H12** montre les différentes régulations présumées de CFTR sur d'autres transporteurs ioniques.

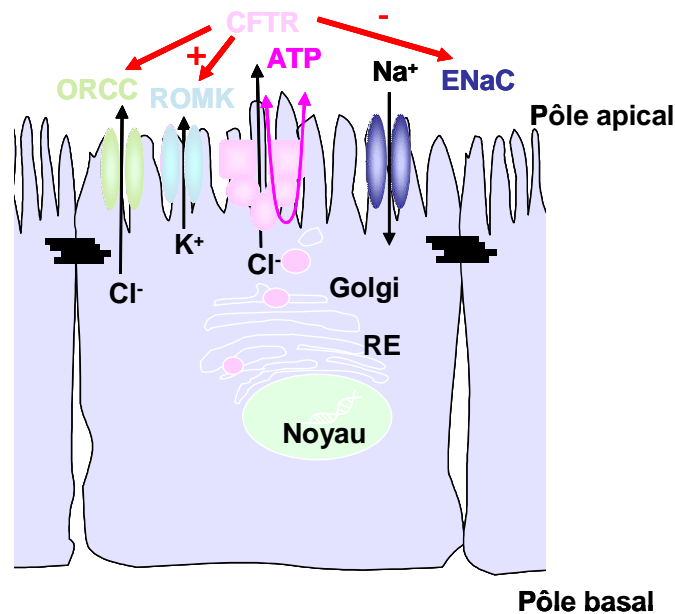


Figure H12: Schéma représentant les différents transporteurs ioniques régulés par la protéine CFTR.

Modifié d'après Schwiebert et al., 1999

1- Les canaux ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel)

Etant donné que dans les cellules mucoviscidosiques, ORCC est inactif et insensible aux protéines kinases A et C (Gabriel *et al.*, 1993), nous pouvons penser que CFTR est impliquée dans sa régulation.

La régulation d'ORCC par la protéine CFTR, *via* les kinases, se fait par un mécanisme autocrine/paracrine impliquant le transport d'ATP dans le milieu extracellulaire. L'ATP ainsi relâché se lie aux récepteurs purinergiques P2R pour stimuler ORCC (Schwiebert *et al.*, 1995). La prévention de la formation d'AMPC inhibe le couplage réactionnel entre CFTR et ORCC (Schwiebert *et al.*, 1998). CFTR faciliterait le relargage d'ATP *via* un canal ou des vésicules relâchant l'ATP dans le milieu extracellulaire (**Figure H13**).

L'activité canal de CFTR et la régulation des autres canaux ne sont pas exclusives. Cependant des expériences de troncation de CFTR ont permis de montrer que les domaines nécessaires aux deux fonctions de CFTR ne sont pas les mêmes. La moitié de CFTR composée de TMD1-NBD1-R (TNR-CFTR) a une perméabilité aux ions chlorure et régule ORCC *via* l'export d'ATP directement ou indirectement. Alors que le TMD1 seul possède une activité canal chlorure mais n'a pas d'activité régulatrice d'ORCC. Ces résultats confirment que ce sont les TM5 et TM6 du TMD1 qui sont liés à la fonction canal de CFTR ; alors que le NBD1 et le domaine R de CFTR sont impliqués dans la régulation d'ORCC (Schwiebert *et al.*, 1998).

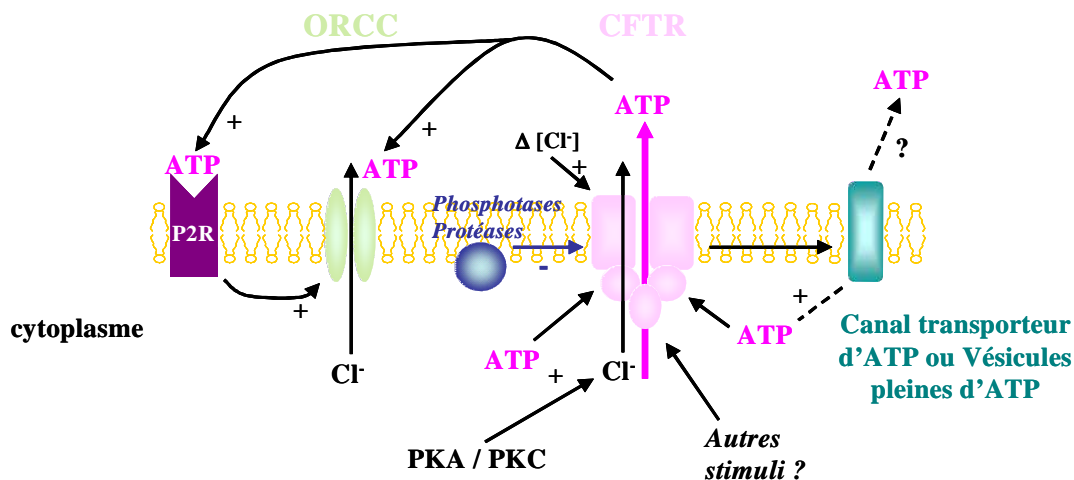


Figure H13: Représentation des protéines et molécules qui pourrait jouer un rôle dans la régulation d'ORCC *via* CFTR.

Ce schéma montre les différentes hypothèses concernant les éventuels cofacteurs, protéines et autres stimuli pouvant être nécessaires d'une part à la régulation d'ORCC par CFTR, et d'autre part aux différentes possibilités d'export de l'ATP dans le milieu extracellulaire.

PKA : protéine kinase dépendant de l'AMPC – PKC : protéine kinase C – P2R : récepteur purinergique P2

Modifié d'après Schwiebert et al., 1999

Pour aller plus en avant dans l'identification des mécanismes impliqués, Schwiebert *et al.* ont utilisé des mutations moyennes situées dans le NBD1 comme G551D. Dans ce cas ils n'observent plus aucune des deux fonctions de CFTR ; ce qui permet d'interconnecter la

régulation d'ORCC à l'export d'ATP dépendant de l'AMPc et donc à un canal CFTR actif. (Schwiebert *et al.*, 1998). L'équipe de F. Becq (Julien *et al.*, 1999) a montré que le glibenclamide inhibe l'activité d'ORCC dans des patchs excisés seulement quand CFTR est aussi exprimée. Cette sensibilité est préservée dans les cellules exprimant CFTR-F508del. Une hypothèse intéressante est que le glibenclamide en se liant à CFTR affecte l'activité des transporteurs localisés autour de CFTR. Sheppard et Robinson suggèrent que le glibenclamide et les ions chlorure rentrent en compétition pour un même site (Sheppard et Robinson, 1997).

2- Les canaux ENaC (Epithelial Sodium Channel)

Les épithélia CF sont caractérisés par une augmentation du courant Na^+ en parallèle d'une absence de sécrétions d'ions Cl^- dépendante de l'AMPc (Hummler *et al.*, 1996).

En effet, en l'absence de CFTR, l'AMPc stimule l'absorption apicale de Na^+ par le canal ENaC sensible à l'amiloride (Stutts *et al.*, 1995). Quand le canal ENaC est exprimé dans les cellules MDCK (Xie et Schafer, 2004) et dans les fibroblastes de souris, il est activé par l'AMPc ainsi que par la PKA, mais exprimé dans l'ovocyte de xénope, il est insensible, suggérant que la régulation par l'AMPc nécessite des protéines régulatrices additionnelles. Mais quand ENaC est co-exprimé avec le canal CFTR, l'effet de l'AMPc sur ENaC est inversé, ce qui se traduit par l'activation de CFTR *via* l'AMPc tout en maintenant l'inhibition d'ENaC (Mall *et al.*, 1996 ; Chabot *et al.*, 1999). Comme ENaC et CFTR sont co-exprimés naturellement dans la même cellule, la conductance en Na^+ peut être inhibée par l'activation de CFTR avec comme conséquence d'une part la diminution de l'absorption en électrolyte et d'autre part la permutation vers la sécrétion en NaCl. L'inhibition d'ENaC par CFTR, dans les épithélia des voies respiratoires (Mall *et al.*, 1998) et le colon (Mall *et al.*, 1999), reflète l'importance du mécanisme par lequel les voies peuvent passer de l'absorption à la sécrétion.

Les bases moléculaires de la régulation négative d'ENaC par CFTR sont très controversées. A ce jour trois hypothèses existent (**Figure H14**) :

- ④ Comme dans le cas de la régulation d'ORCC, le canal CFTR serait impliqué dans l'export de l'ATP intracellulaire. Ce dernier inhiberait le transport transépithélial de Na^+ par l'activation de la phospholipase C et de la PKC liée au récepteur purinergique P2R (Schreiber *et al.*, 1999).
- ④ CFTR serait en interaction directe avec une ou plusieurs sous-unités d'ENaC. Des analyses de double hybride menées par l'équipe de Kunzelmann ont montré que les domaines NBD1 et R de CFTR étaient capables d'interagir directement avec le C-

terminal d'ENaC (Kunzelmann *et al.*, 1997). Ils ont également mené des expériences de troncation de CFTR et ont mis en évidence que NBD1 est essentiel à la régulation négative d'ENaC (Schreiber *et al.*, 1999). De plus la mutation G551D située dans le NBD1 détruit cette interaction (Stutts *et al.*, 1995).

- CFTR et ENaC interagiraient *via* des éléments associés à la membrane et au cytosquelette. Ce serait cette interaction indirecte qui permettrait à CFTR d'interférer avec la régulation d'ENaC *via* la PKA. Le mécanisme est encore inconnu. Toutefois il a été montré que les canaux CFTR (Cantiello, 1996) et ENaC (Berdiev *et al.*, 1996) sont affectés par les interactions avec les protéines du cytosquelette comme l'actine. Ainsi, l'expression variable d'une protéine régulatrice ou d'une protéine liant CFTR ou ENaC au cytosquelette permettrait d'expliquer la régulation tissu spécifique d'ENaC par CFTR. L'actine pourrait être une de ces protéines (Schwiebert *et al.*, 1999).

Renforçant cette hypothèse, une étude récente effectuée sur des cellules MDCKI stablement transfectées par ENaC et CFTR a permis de montrer que CFTR régule non seulement l'activité d'ENaC mais aussi sa stabilité à la membrane plasmique (Lu *et al.*, 2007).

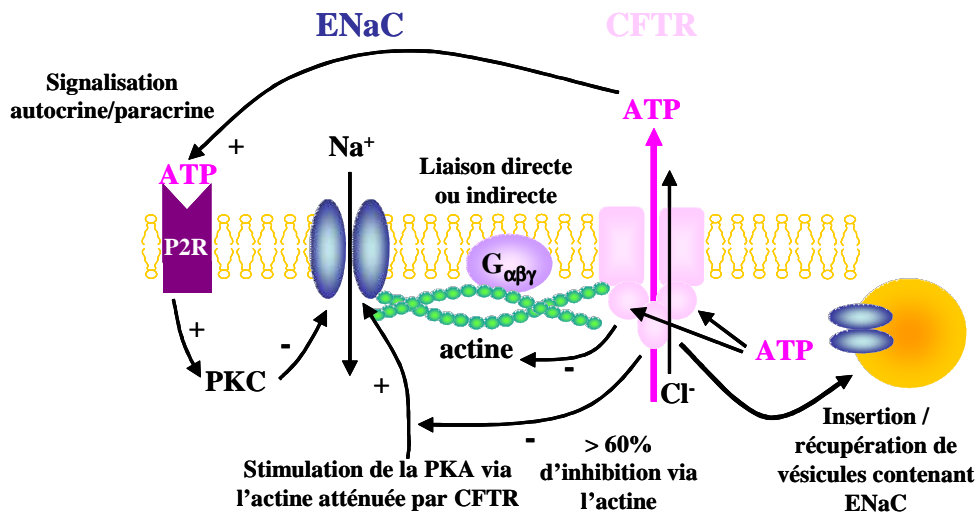


Figure H14: Régulation hypothétique du canal ENaC par CFTR.

Ce modèle montre l'interaction entre CFTR et ENaC dans laquelle la signalisation autocrine ou paracrine facilite l'interaction directe ou indirecte entre les deux protéines *via* l'ATP. La modulation par CFTR de l'insertion et de la récupération des vésicules contenant ENaC est aussi illustrée.

$G_{\alpha\beta\gamma}$: protéine G hétérotrimérique inconnue.

Modifié d'après Schwiebert *et al.*, 1999

Dans les épithélia respiratoires et intestinaux, l'activité d'ENaC est inhibée par CFTR. Cependant, des études ont montré que dans les glandes sudoripares, épithélium purement absorbant, l'activité d'ENaC est dépendante et augmente avec l'activité de CFTR (Reddy et Quinton, 2003). Les études menées suggèrent que ni la phosphorylation ni l'ATP ne sont nécessaires à l'activation d'ENaC par CFTR. Toutefois cette activation requière la fonction canal Cl^- . De plus les auteurs ont montré que l'activation d'ENaC n'est pas due à l'AMPc ou aux protéines G mais plutôt à la fonction canal Cl^- de CFTR (Reddy et Quinton, 2006).

Il semblerait donc que la direction du courant Cl^- influence le mécanisme d'interaction entre CFTR et ENaC puisque ENaC est activé lorsque le Cl^- est absorbé, alors qu'ENaC est inhibé lorsque le Cl^- est sécrété.

3- Les canaux ROMK (Renal Outer Medullary Potassium channel)

La sécrétion d'ions potassium, K^+ , est assurée par une famille de canaux appelés Kir (K^+ Inward Rectifier channel) qui comprend les canaux K_{ATP} , les canaux $\text{Kir}_{6,x}$ et les canaux rénaux ROMK (Renal Outer Medullary Potassium channel). Ces derniers sont impliqués dans le recyclage du K^+ au niveau de la membrane apicale des cellules rénales ; d'autres canaux similaires sont trouvés au niveau des voies respiratoires (Loussouarn *et al.*, 1996). L'expression et la fonction de ROMK sont régulées par un grand nombre de facteurs comme le pH intracellulaire et l'ATP intra et extracellulaire et sont inhibées par le glibenclamide (Ruknudin *et al.*, 1998).

Des études *in vitro* suggèrent que CFTR est nécessaire à l'inhibition de ROMK par l'ATP cytosolique et le glibenclamide (Ruknudin *et al.*, 1998). Les études réalisées sur l'effet de CFTR sur la fonction de ROMK laissent penser d'une part, que l'interaction de ces protéines se fait par une protéine à domaine PDZ comme NHERF (Na^+/H^+ Exchanger Regulatory Factor) (Yoo *et al.*, 2004), et d'autre part que cet effet requière le TMD1, le NBD1 et le domaine R de CFTR (McNicholas *et al.*, 1997 ; Cahill *et al.*, 2000) (**Figure H15**). L'équipe de Hebert a montré que la protéine CFTR située à la membrane plasmique confère la sensibilité de ROMK à l'ATP et au glibenclamide dans le rein de souris (Lu *et al.*, 2006).

Toutes ces observations permettent de supposer que l'interaction entre CFTR et ROMK est similaire à ce qui a déjà été observé pour les canaux K_{ATP} . Le récepteur au sulfonyleurée, SUR1/2, un transporteur ABC, confère la sensibilité au glibenclamide au K_{ATP} et augmente l'interaction ATP dépendante entre les sous-unités $\text{Kir}_{6,x}$ (Inagaki *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent un modèle général pour la régulation des canaux K^+ par les ABC.

Dans le cas de CFTR/ROMK, l'interaction n'est pas directe mais fait intervenir la protéine NHERF (Lu *et al.*, 2006).

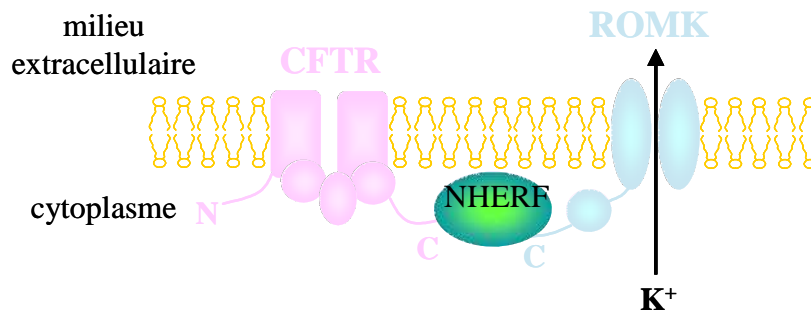


Figure H15: Modèle hypothétique de l'interaction entre CFTR et ROMK.
L'interaction se fait grâce à une protéine à domaine PDZ, probablement NHERF.

Modifié d'après Schwiebert et al., 1999 et Yoo et al., 2004

4- Les aquaporines

Les aquaporines (AQPs) sont des canaux d'environ 30kDa constitués de six hélices α transmembranaires facilitant le transport bidirectionnel de l'eau à travers la membrane. Les AQPs sont impliquées dans un nombre croissant de fonctions de l'épithélium (Verkman, 2005). Il a été observé qu'il existait une différence de perméabilité à l'eau après l'activation de CFTR par l'AMPC dans les ovocytes de Xénope (Schreiber *et al.*, 1997) suggérant que CFTR régulerait un canal transportant de l'eau. En 1999, l'équipe de Schreiber a montré qu'il s'agissait de l'AQP3 dans ce système cellulaire, mais également dans d'autres cellules (CHO, HEK193) (Schreiber *et al.*, 1999). Cependant, dans les cellules des voies aériennes, il n'y a pas d'activation de perméabilité à l'eau dépendante de CFTR. L'AQP9 d'épididyme de rat a été co-introduite avec CFTR dans des ovocytes de Xénope (Cheung *et al.*, 2003). Les auteurs observent alors une augmentation de la perméabilité à l'eau et il semble que le domaine NBD1 soit essentiel pour cette activité. D'autres aquaporines comme AQP1 et AQP5 ont été co-localisées avec CFTR dans les cellules pancréatiques humaines (Burghardt *et al.*, 2003) et dans les cholangiocytes où AQP1 co-localise avec CFTR et l'échangeur d'anions AE2 (Banales *et al.*, 2006). Ce sont des cellules épithéliales hépatiques localisées dans les conduits biliaires, où elles permettent la dilution et l'alcalinisation de la bile. CFTR jouerait donc un rôle important dans ces processus *via* son activation AMPC-dépendante permettant ainsi la sécrétion de Cl^- et de HCO_3^- . En effet, l'AMPC induit un trafic coordonné de vésicules contenant CFTR, AQP1 et AE2 vers la membrane luminale des cholangiocytes, et résultant ainsi en un mouvement passif d'eau et de bicarbonate (Banales *et al.*, 2006).

Un autre exemple de l'interaction entre CFTR et les AQP est l'épithélium de la cornée. Le transport de fluide implique généralement un transport secondairement actif de Cl^- qui crée le gradient osmotique nécessaire au transport transépithélial de l'eau (Hamann, 2002). Les profils d'expression des AQP et de CFTR dans l'épithélium de la cornée et de la rétine suggèrent leurs implications dans la régulation du volume des larmes, des fluides aqueux et de la pression intramoléculaire (Da et Verkman, 2004). Les patients mucoviscidosiques souffrent quelque fois d'œdème cornéen, de décollement de la rétine ou d'une altération de l'hydratation de la surface de l'œil, confirmant l'importance de CFTR dans le transport de l'eau *via* les AQP. Reigada et Mitchell (Reigada et Mitchell, 2005) ont montré que le canal CFTR est exprimé de manière fonctionnelle dans l'épithélium de la cornée et des pigments rétinien. La régulation de la sécrétion active de Cl^- et de l'absorption du Na^+ détermine la sécrétion d'eau et des larmes. Le mode d'interaction entre CFTR et les AQP n'est pas encore bien défini. En plus de l'AMPc qui permet d'activer CFTR et les AQP, Saxena a montré que les Rab GTPases modulent la fonction de CFTR, des AQP et d'ENaC (Saxena *et al.*, 2006).

D'autres travaux ont montré que CFTR pouvait transporter de l'eau. Mais ces derniers sont restés aux stades d'observations (Hasegawa *et al.*, 1992).

5- Les échanges $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

Les ions bicarbonate (HCO_3^-) sont importants pour le maintien du pH intracellulaire. La sécrétion de HCO_3^- peut être assurée de deux façons : par le couplage de CFTR et d'un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (ou d'un canal HCO_3^-) ou bien par CFTR lui-même (Seidler *et al.*, 1997). Il a été montré que CFTR régulait un échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dans des cellules surexprimant CFTR comme les NIH3T3 ou HEK 293 mais également dans les tissus exprimant de façon endogène CFTR comme les conduits pancréatiques (Lee *et al.*, 1999a et b) ou le duodénum de rat et de lapin (Choi *et al.*, 2001). Le canal CFTR a une conductance aux ions HCO_3^- et celle-ci est abolie lorsque CFTR est inactif ou bien lorsqu'il n'est pas à la membrane plasmique apicale (Reddy *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent un rôle des ions HCO_3^- dans la mucoviscidose et explique les insuffisances pancréatiques sévères rencontrées chez certains malades dues à l'alcalinisation incorrecte du suc pancréatique qui conduit à une activation d'enzymes digestives qui détruisent le pancréas.

Le bicarbonate joue également un rôle primordial dans l'alcalinisation de la bile *via* la sécrétion active d'ions HCO_3^- par les cholangiocytes en réponse à la sécrétine. Le changement

dans le pH intracellulaire induit par l'excrétion de HCO_3^- dans la bile nécessite une régulation de ce pH *via* les transporteurs ioniques comme CFTR. La fixation du glucagon sur son récepteur induit une augmentation du niveau d'AMPC intracellulaire qui active la PKA et stimule ainsi l'échangeur anionique AE2 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), permettant ainsi la diffusion d'eau *via* l'AQP. Le Cl^- ainsi importé dans la cellule va être excrété par CFTR au niveau de la membrane apicale permettant ainsi le maintien du gradient de Cl^- et le maintien de l'activation de AE2 (Banales *et al.*, 2006).

D. CFTR : protéine d'interactions

1- Interaction avec la partie C-terminale de CFTR

Les domaines PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) sont des motifs d'environ 90 acides aminés permettant des interactions protéiques principalement avec le domaine carboxy-terminal des protéines cibles et sont trouvés chez toutes les espèces. Le domaine PDZ régule les interactions protéines-protéines, les clusters de protéines et la co-localisation de transporteurs, de canaux et de protéines de signalisation au niveau de sous-domaines cellulaires. Les protéines contenant des domaines PDZ contiennent souvent d'autres motifs d'interaction protéine-protéine tels que le motif de fixation à l'eitrine, à la radixine et à la moesine (domaine ERM).

Le canal CFTR interagit avec de nombreux canaux et transporteurs qui régulent le canal soit au niveau de son expression soit au niveau de sa fonction. Le domaine C-terminal de CFTR possède une séquence consensus (1477-DTRL-1480) reconnue par des domaines PDZ (Hegedus *et al.*, 2003). Cette extrémité est très conservée chez différentes espèces et n'est pas indispensable à l'activité canal chlorure de CFTR mais l'est pour sa localisation apicale (Moyer *et al.*, 2000) et sa stabilité (Haardt *et al.*, 1999).

La première protéine à domaine PDZ à avoir été trouvée interagir avec CFTR est l'isoforme 1 du NHERF dont l'homologue humain est EBP50 (Ezrin Binding Protein 50KDa). D'autres protéines, par la suite, ont été identifiées : NHERF2 et 4, CAP70 (CFTR Associated Protein 70KDa) et CAL (CFTR Associated Ligand) (Li et Naren, 2005 ; Thelin *et al.*, 2005). NHERF1 et 2 possèdent dans leur partie C-terminale, un domaine ERM qui se lie à l'eitrine ; ce qui permet aux protéines liées au NHERF d'interagir avec l'actine dans la partie apicale de la cellule. Haggie a montré par des expériences de FRAP que les domaines PDZ de NHERF interagissent avec CFTR au niveau de la membrane plasmique de manière extrêmement dynamique (Haggie *et al.*, 2004). Cette interaction inhibe l'activité et la

perméabilité aux ions chlorure de CFTR (Benharouga *et al.*, 2003). La présence de ce domaine PDZ laisse suggérer une possible dimérisation de CFTR *via* ce domaine. Il a été suggéré que NHERF1 et CAP70 induit cette dimérisation. Ce phénomène est supposé faciliter les interactions intermoléculaires de CFTR *via* le domaine R (Riordan *et al.*, 2005). Cependant l'expression de deux canaux CFTR avec des caractéristiques fonctionnelles distinctes ne donne pas de canal hybride (Gadsby *et al.*, 2006).

L'interaction de CFTR avec les domaines PDZ de NHERF1 et CAL régule le niveau de CFTR à la membrane plasmique. Le trafic de CFTR vers la membrane requière la liaison du NHERF1 à la fois au C-terminal de CFTR et à l'actine *via* l'eitrine (Swiatecka-Urban *et al.*, 2002). CAL régule le trafic de CFTR (**Figure H16**).

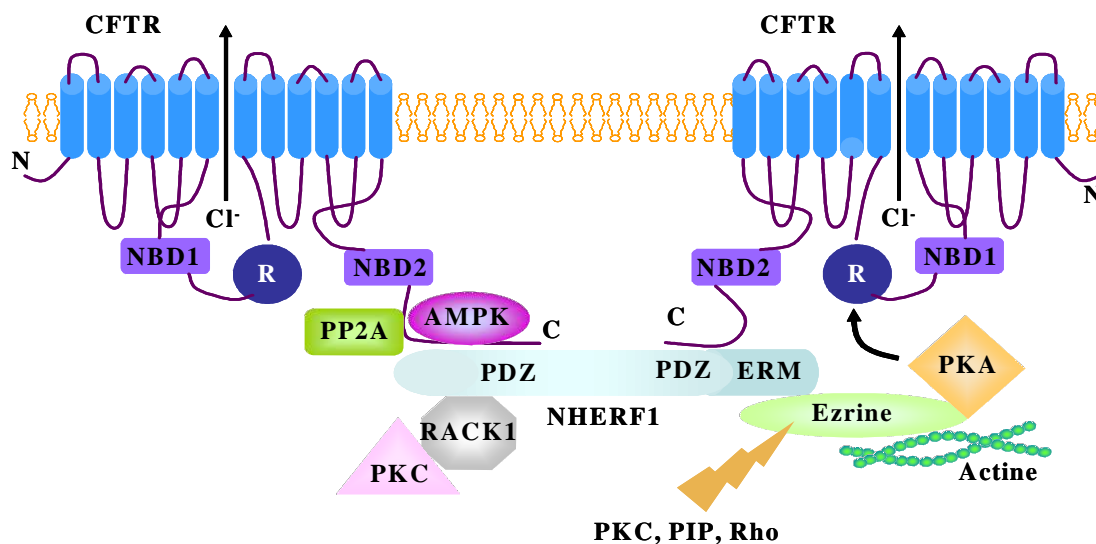


Figure H16: Interactions régulant l'activité de CFTR à la membrane plasmique

Plusieurs protéines interagissent directement ou indirectement avec CFTR, comme la protéine phosphatase-2A (PP2A) et l'AMP Kinase (AMPK). Ces protéines inhibent l'activité du canal et diminuent la sécrétion de Cl⁻ à travers la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales. D'autres protéines interagissant avec CFTR augmentent son activité, comme l'isoforme 1 du Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (NHERF1), le récepteur pour l'activation de la Kinase C-1 (RACK1), la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase A (PKA) et Ezrine.

ERM : ezrin, radixin, moesin binding domain - NBD: nucleotide binding domain - PIP2: phosphatidylinositol biphosphate - R: regulatory domain

D'après Guggino et Stanton, 2006.

En effet, la surexpression de CAL provoque une réduction du nombre de canaux CFTR à la membrane et facilite le trafic de CFTR vers les lysosomes (Cheng *et al.*, 2004). Cet effet peut être inversé par la surexpression de NHERF1. Par conséquent, la régulation de la phosphorylation de CFTR dépend de son interaction avec les protéines telles que PKA, PP2A

et PKC au sein d'un complexe macromoléculaire formé par les interactions *via* les domaines PDZ.

2- Interaction avec la partie N-terminale de CFTR

Il existe également une régulation de l'adressage de CFTR impliquant des protéines SNARE (SNAP REceptor) liées au trafic intracellulaire. Parmi ces protéines, la syntaxine 1A est connue pour former un complexe avec les protéines SNAP-25 et VAMP-2 régulant le trafic vers la membrane plasmique (Sutton *et al.*, 1998). La syntaxine A1 interagit également avec la partie N-terminale de CFTR, inhibant le courant Cl^- médié par CFTR. En effet, la syntaxine A1 en se liant au N-terminal de CFTR empêche son interaction avec le domaine R et/ou NBD1 (Naren *et al.*, 1999). Une étude récente a permis d'identifier un résidu essentiel à l'interaction spécifique entre CFTR et la syntaxine A1. Il s'agit d'un acide aminé hydrophile localisé dans le domaine H3 (Ganeshan *et al.*, 2003). La syntaxine 8, impliquée dans le trafic des endosomes précoces aux endosomes tardifs, inhibe l'activité canal Cl^- de CFTR ainsi que son export vers la membrane plasmique. Cette régulation est due à une interaction directe ou *via* un complexe de protéines (Bilan *et al.*, 2003).

La protéine Csp (Cystein string protein) est connue pour interagir et réguler l'association en complexe des protéines SNARE comme la syntaxine 1A, syntaxine 4 ou le VAMP. Les protéines Csp, syntaxine A1 et CFTR interagissent physiquement et fonctionnellement (Naren *et al.*, 1997 ; Chamberlain *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2002). Ainsi, Csp pourrait, par sa faculté à s'associer avec les protéines SNARE et CFTR, fournir un nouveau mécanisme de régulation en couplant l'activation du canal CFTR avec son transport par une machinerie incluant les protéines SNARE et leur fonction dans le trafic intracellulaire.

IV/ Biologie cellulaire de la protéine CFTR

A. La protéine CFTR sauvage

1- Généralités sur la biosynthèse de la protéine CFTR

La biosynthèse de CFTR se fait en trois étapes, la transcription du gène *CFTR* en ARNm, l'épissage du message, puis la traduction de l'ARNm en protéine. La traduction a lieu au niveau du ribosome qui reçoit les ARNt et l'ARNm. La séquence N-terminale de CFTR est une séquence linéaire hydrophobe, nommée peptide signal, qui permet l'ancrage du complexe ARNm/ribosome au RE *via* le SRP (Signal Recognition particule), formant ainsi le complexe ribosome-translocon (RTC). Le canal de translocation, constitué de plusieurs protéines, dont le Sec61, fixe ensuite le peptide signal. L'entrée de la chaîne polypeptidique dans le RE ne se fait que lorsqu'elle compte au moins 70 acides aminés (**Figure H17**). La translocation de CFTR est alors initiée dans la lumière du RE, suivi par l'orientation des boucles cytoplasmiques et par l'insertion des segments transmembranaires dans la bicouche lipidique du RE (Sadlish et Skach, 2004).

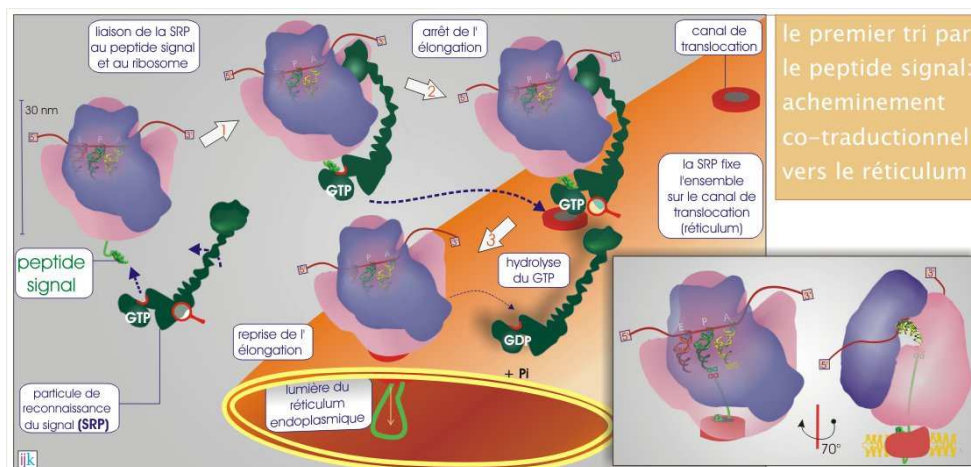


Figure H17: Le peptide signal, son récepteur SRP et la translocation vers le RE

D'après <http://www.ulyse.u-bordeaux.fr>

Le repliement de CFTR se fait de manière co-traductionnelle puisque le domaine N-terminal acquiert une activité fonctionnelle alors que le domaine C-terminal est en cours de synthèse au niveau du ribosome (Chen *et al.*, 2000). Cependant, d'autres études sont en faveur d'un repliement post-traductionnel (Chen *et al.*, 2004 ; Du *et al.*, 2005). Une fois le repliement de la protéine CFTR terminé, elle acquiert la conformation de protéine canal par

des modifications post-traductionnelles qui lui permettent de quitter le RE, ou en cas de mauvais repliement, d'être dirigée vers la voie de dégradation protéolytique. En effet, le RE contient de nombreuses protéines chaperonnes, sous forme de complexes multiprotéiques, comme BiP, Grp94, la calréticuline et la calnexine, qui sont capables de reconnaître les domaines de protéines naissantes dans leur état provisoire et d'assurer leur repliement approprié. Parmi les chaperonnes du RE, seule la calnexine, se liant spécifiquement à certains résidus glucidiques, est connue pour interagir avec la protéine CFTR naissante (Pind *et al.*, 1994) (**Figure H18**).

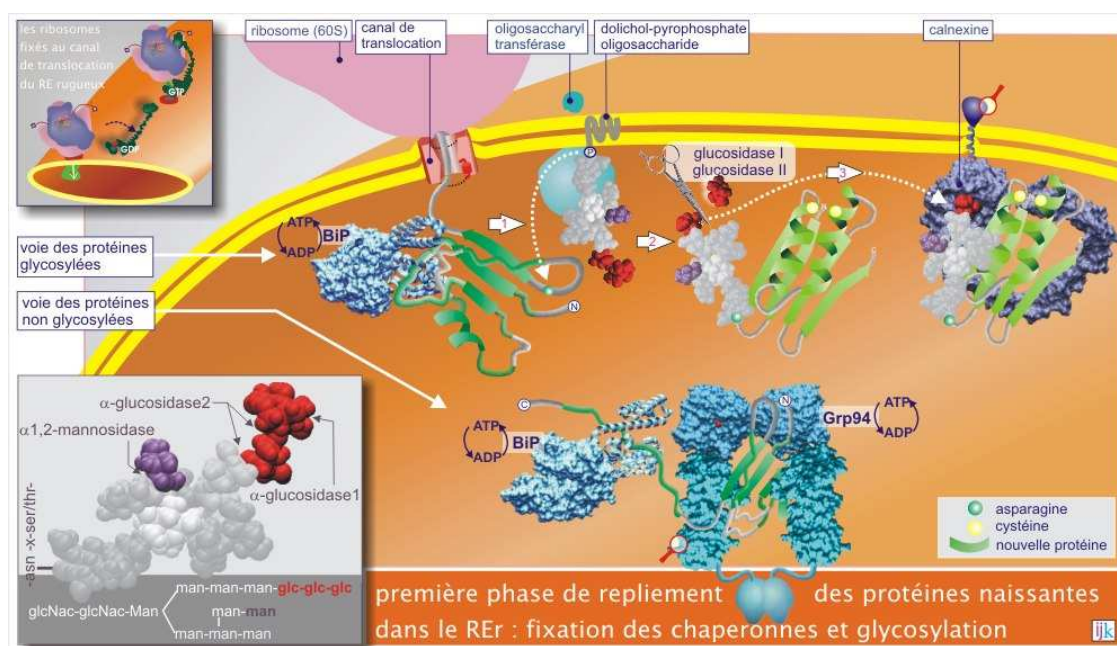


Figure H18: Fixation de chaperonnes et glycosylation des protéines naissantes

D'après <http://www.ulyse.u-bordeaux.fr>

2- Maturation de la protéine CFTR

Dans le RE, a lieu l'addition co-traductionnelle d'un oligosaccharide sur la protéine CFTR en cours de synthèse. Cette addition, appelée N-glycosylation, se fait sur les asparagines (N) 894 et 900 de la 4^{ème} boucle extracellulaire de CFTR. L'oligosaccharide précurseur, une unité de 14 résidus glucidiques comprenant : 2 N-acétylglucosamines (GlcNAc), 9 mannoses et 3 glucoses, est greffée à la chaîne polypeptidique naissante par l'oligosaccharyltransférase. Puis, les deux glucoses terminaux sont immédiatement enlevés par l' α 1,3-glucosidase II et l' α 1,2-glucosidase I. La protéine monoglucosylée, appelée core-

glycosylée, est reconnue par la calnexine qui favorise son repliement. Après un laps de temps, durant lequel la protéine a atteint un certain degré de repliement, le glucose restant est éliminé par l' α 1,3-glucosidase II. La protéine CFTR se sépare alors de la calnexine, et est apte à être transportée vers l'appareil de Golgi (**Figure H18**).

La maturation de la protéine CFTR, qui a lieu dans les compartiments du Golgi, se traduit par une augmentation de son poids moléculaire de 20kDa, due aux modifications enzymatiques réalisées dans l'appareil de Golgi et consistant en la maturation des glycanes N-liés, lui donnant ainsi sa forme hautement glycosylée. La protéine CFTR mature, appelée complexe-glycosylée, est ensuite dirigée vers la membrane plasmique par des vésicules. Une fois délivrée à la membrane, la protéine canal est rapidement internalisée en une réserve subapicale de protéines qui pourra être recyclée ou envoyée vers la voie de dégradation lysosomale.

Durant sa biosynthèse, la protéine CFTR existe au moins sous quatre formes de glycosylation différentes (Cheng *et al*, 1990 ; Lukacs *et al.*, 1994 ; Ward et Kopito, 1994), qui sont nommées : forme A, forme B, forme B' et forme C (**Figure H19**).

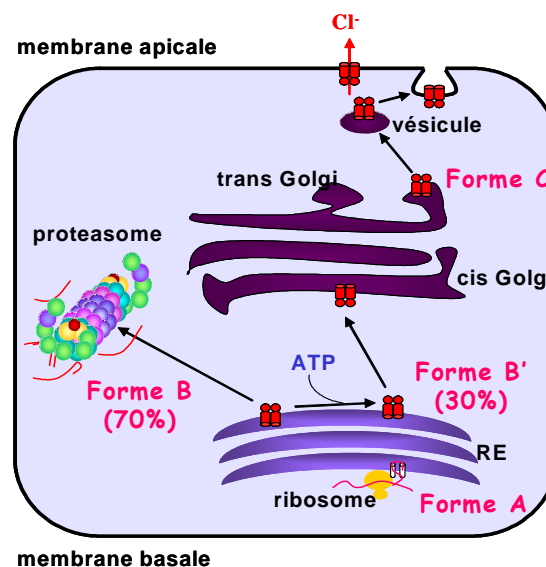


Figure H19: Les différentes formes glycosylées de la protéine CFTR au cours de sa voie de biosynthèse.

Modifié d'après Cheng et al, 1990 ; Lukacs et al., 1994 ; Ward et Kopito, 1994

La forme A correspond au précurseur non glycosylé de CFTR sortant du ribosome dont le poids moléculaire avoisine les 130 kDa. Ce précurseur est rapidement glycosylé au niveau des N894 et N900, par l'oligosaccharyltransferase associée au RTC (Kowarik *et al.*, 2002), pour donner la forme B de 140 kDa (aussi appelée forme immature ou core-

glycosylée) (Lukacs *et al.*, 1994) (**Figure H17**). Cette molécule contient une chaîne d'oligosaccharides très riche en mannose, ce qui l'a rend sensible à l'endoglycosidase H (endo H) (Ward et Koptito, 1994).

A la fin du processus, 70% de la forme B de la protéine CFTR sauvage sont rapidement dégradés par une voie de dégradation mal identifiée avec une demi-vie de 20 à 40 minutes (Lukacs *et al.*, 1994). Les 30% restant, dénommés forme B', passent par une étape de maturation ATP-dépendante qui leur confère une résistance aux protéases. Au niveau du Golgi, la forme B' subit une maturation donnant ainsi naissance à la forme C, protéine hautement glycosylée (forme mature ou complexe-glycosylée) de 170 kDa résistante à l'endo H (Kopito, 1999), qui s'insérera dans la membrane plasmique (**Figure H20**).

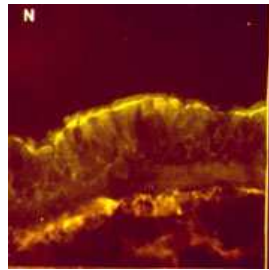


Figure H20: Localisation de la protéine CFTR sauvage dans l'épithélium bronchique humain sain

La protéine CFTR, identifiée à l'aide d'un anticorps anti-CFTR est localisée au niveau de la membrane apicale des cellules bordant la muqueuse respiratoire.

D'après : www.canal-u.education.fr

Le blocage des protéines immatures au niveau du RE est un phénomène souvent observé suite à des mutations dans le domaine NBD1 (Zhang *et al.*, 1998). Ce blocage est sensible à la température (Sharma *et al.*, 2004). Le faible taux de maturation de la protéine CFTR n'est pas une caractéristique propre aux transporteurs ABC puisque certains atteignent 100% de maturation dans des modèles cellulaires recombinants. Cependant, il existe une controverse au sujet de l'efficacité de maturation de la protéine CFTR sauvage. L'équipe de Cheng a émis l'hypothèse qu'une surexpression de la protéine CFTR pouvait être la cause de cette déficience de maturation dans les systèmes d'expression hétérologue (Cheng *et al.*, 1990) ; en effet, le nombre de copies élevé de CFTR produit serait trop important par rapport à la quantité de facteurs d'assemblage présent. Une autre hypothèse serait que cette défaillance soit due à l'immortalisation et la transformation des cellules primaires en lignée stable. Une étude a montré que seules 20 à 35% des protéines nouvellement synthétisées

étaient converties en forme mature dans les systèmes d'expression hétérologue COS-7 et HeLa, mais qu'au contraire, la maturation de la protéine avoisinait les 100% dans deux types cellulaires (Calu-3 et T84) exprimant de façon endogène la protéine CFTR (Varga *et al.*, 2004).

3- Rôle de l'ATP dans la voie de biosynthèse de la protéine CFTR

L'ATP joue un rôle important dans le repliement et la maturation de la protéine CFTR au niveau du RE. Des expériences utilisant la brefeldine A (BFA), un inhibiteur de la formation vésiculaire depuis le RE, démontrent que l'ATP intervient dans le processus permettant le passage de la forme B à la forme B' (acquisition de la résistance aux protéases) (Braakman *et al.*, 1992 ; Lukacs *et al.*, 1994). Cependant, le rôle de l'ATP reste à définir et différentes possibilités peuvent être envisagées :

- ④ Le bon repliement de CFTR serait lié à la liaison de l'ATP sur l'un des NBDs de la protéine. Cette hypothèse pourrait expliquer l'impossibilité de CFTR-F508del à poursuivre sa maturation du fait de l'altération locale du repliement au niveau du domaine NBD1 lié à la mutation F508del.
- ④ La fixation de chaperonnes, ATP-dépendantes, à la protéine CFTR sauvage en présence d'ATP peut être nécessaire au bon repliement de la protéine. Inversement, il est envisagé que les protéines jugées comme incorrectement repliées soient séquestrées par les chaperonnes, puis orientées vers la voie de dégradation.
- ④ L'ATP pourrait jouer un rôle dans la phosphorylation d'un ou de plusieurs sites consensus de phosphorylation sur la protéine CFTR, favorisant ainsi la maturation.

4- Le transport intracellulaire de CFTR

La protéine CFTR est transportée jusqu'à la membrane apicale des cellules épithéliales où elle assurera sa fonction de canal chlorure. La voie empruntée par CFTR de la sortie du RE jusqu'à la membrane plasmique reste encore très imprécise. La localisation intracellulaire de CFTR est intéressante, puisque, CFTR est présente dans de nombreux compartiments comme le RE, le Golgi, les endosomes et les lysosomes (Bertrand et Frizzell, 2003).

☞ Le ERGIC ou compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi

La protéine CFTR ayant atteint sa conformation native est exportée hors du RE dans des vésicules COPII qui bourgeonnent depuis certains sites du RE (Schekman et Orci, 1996 ; Wang *et al.*, 2004). Les vésicules COPII sont composées de protéines recouvrantes Sec23p/Sec24p, Sec13p/Sec31p et de la GTPase Sar1 (Kuehn et Schekman, 1997). Quand les vésicules se sont débarrassées de leur manteau protéique, elles fusionnent avec un complexe tubulo-vésiculaire appelé ERGIC (ER/golgi Intermediaire Compartment) ou VTC (Vesicular Tubular Cluster), situé du côté *cis* du Golgi (Aridor *et al.*, 1995). Il est caractérisé par la présence d'une protéine transmembranaire non glycosylée de 53kDa : ERGIC53 (p53/p58), de p63 et de la t-SNARE syntaxine 5 (Pelham, 1997 ; Schweizer *et al.*, 1993). ERGIC53 joue le rôle de protéine de liaison aux vésicules dans le transport ER-Golgi de la majorité des protéines transmembranaires. Cependant, aucune interaction entre la protéine CFTR sauvage et ERGIC53 n'a été décrite, même si une co-localisation a pu être observée entre la protéine CFTR-F508del et ERGIC53 (Gilbert *et al.*, 1998).

Pour pouvoir emprunter cette voie de transport, la protéine possède un code de sortie consistant en deux acides aminés (D565 et D567) exposés à la surface du NBD1. Ce signal d'export du RE aide au recrutement du canal CFTR *via* le complexe COPII. La mutation de ce code di-acidique (563YKDAK567) résulte en une rétention de la protéine CFTR dans le RE, sûrement par interférence de l'interaction entre CFTR et le complexe Sec23/Sec24 (Wang *et al.*, 2004). D'autres motifs peptidiques (RXR, où X représente n'importe quel acide aminé) ont été identifiés sur la protéine CFTR. Ils contribuent au retour des protéines CFTR de conformation incorrecte vers le RE. Si la protéine est reconnue comme mal repliée au niveau du Golgi, elle subira un transport rétrograde *via* les vésicules COPI du *cis*-Golgi vers le RE. Toutefois ce mécanisme reste mal connu (Hegedus *et al.*, 2006).

☞ Le rôle de l'appareil de Golgi dans le trafic de CFTR

Deux voies d'adressage alternatives ont été décrites pour la voie de sécrétion de la protéine CFTR suivant son export *via* les vésicules COPII (Yoo *et al.*, 2002).

La voie classique d'acheminement de CFTR, à travers de l'appareil de Golgi consiste en un transfert progressif des compartiments *cis*- vers le *trans*-Golgi *via* le Golgi médian, concomitant avec la maturation des oligosaccharides. Cette voie a été montrée dans les lignées cellulaires HeLa et HEK293 (Wang *et al.*, 2004).

La seconde voie, non conventionnelle, implique un transfert vésiculaire direct entre le RE et le compartiment *trans*-golgien (Yoo *et al.*, 2002). Okiyoneda *et al.* indiquent que, dans

les cellules BHK et CHO, la protéine CFTR est transportée du RE vers le *cis*-Golgi et les endosomes précoces. Cette voie serait suivie d'un système de recyclage dépendant de la syntaxine 13 (marqueur des endosomes tardifs). Ils pensent que le transport de CFTR aux endosomes précoces est nécessaire pour que la maturation des arbres oligosaccharidiques de CFTR s'accomplisse dans le compartiment *cis*-golgien (Okiyoneda *et al.*, 2004). Cette seconde voie est en accord avec l'accumulation négligeable de la protéine CFTR observée dans l'appareil de Golgi.

☞ Le transport de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique

Le transport de la protéine CFTR jusqu'à la membrane plasmique des cellules reste relativement mal connu. Cependant, il est établi que les interactions protéines-protéines jouent un rôle primordial dans le trafic cellulaire de la protéine CFTR. Parmi elles, l'association entre le C-terminal de CFTR (1476DTRL) et des protéines possédant un domaine PDZ a été plus particulièrement étudiée (Cheng *et al.*, 2002). La première protéine à avoir été identifiée comme interagissant avec l'extrémité C-terminale de CFTR est la protéine NHERF (Hall *et al.*, 1998 ; Short *et al.*, 1998), contenant deux domaines PDZ et un domaine C-terminal ERM. Les domaines PDZ se fixent au motif 1476DTRL de CFTR et le domaine ERM se fixe aux éléments du cytosquelette comme l'actine (Short *et al.*, 1998). Il a été montré que NHERF peut non seulement activer le canal CFTR par phosphorylation (Raghuram *et al.*, 2003) mais aussi contribuer à l'expression apicale de CFTR dans les cellules épithéliales (Moyer *et al.*, 1999, 2000 ; Swiatecka-Urban *et al.*, 2002). En effet, la délétion d'au moins 26 acides aminés ($\Delta 26$), incluant le motif DTRL de CFTR, provoque l'accumulation du canal à la membrane latérale des cellules MDCKII ou des cellules bronchiques (Moyer *et al.*, 1999, 2000) et entraîne la perte quasi-totale (>97%) de l'activité de CFTR (Moyer *et al.*, 2000). Cependant, d'autres études sont en contradiction avec ces résultats. Il semblerait, en effet, que la dissimulation du DTRL ou la perturbation du complexe NHERF/CFTR ne semble pas avoir d'incidence significative sur la localisation apicale, la stabilité et l'activation du canal CFTR (Ostedgaard *et al.*, 2003 ; Benharouga *et al.*, 2003).

En résumé, ces résultats suggèrent fortement que l'expression apicale de la protéine CFTR, dans les cellules polarisées, implique des signaux supplémentaires, en plus du C-terminal et du motif de liaison au domaine PDZ de CFTR.

5- L'endocytose et le recyclage de CFTR

Après avoir atteint la membrane plasmique, CFTR est rapidement internalisée. Ce phénomène a été décrit dans les systèmes d'expression hétérologue et endogène (Prince *et al.*, 1994 ; Bertrand *et al.*, 2003). L'équipe de Lukacs a montré que, dans les cellules CHO, cette internalisation est médiée par des vésicules à manteau de clathrine vers les endosomes (Lukacs *et al.*, 1997). Les motifs tyrosine et di-leucine au niveau de la partie C-terminale sont responsables du signal d'endocytose (Prince *et al.*, 1999 ; Hu *et al.*, 2001 ; Weixel et Bradbury, 2000). Le recrutement de CFTR au sein de ces vésicules est aidé par le complexe qu'elle forme avec la myosine VI et la protéine adaptatrice Disabled 2 (Dab2) (Swiatecka-Urban *et al.*, 2002). Ceci permet, à la cellule, de réguler le nombre de canaux CFTR à la surface apicale des cellules épithéliales.

L'internalisation de CFTR se fait *via* des motifs spécifiques et avec des protéines adaptatrices spécifiques de la membrane plasmique telles que les complexes AP-1 et AP-2 (la sous-unité $\beta 2$ d'AP-2 se lie à la clathrine) (Bradbury *et al.*, 1994). AP-1 participe au transport du TGN vers d'autres compartiments tels que les lysosomes, alors qu'AP-2 intervient au niveau de la membrane plasmique. Après bourgeonnement d'une vésicule de clathrine depuis la membrane plasmique et perte de son manteau de clathrine, AP-2 et la clathrine sont alors recyclées à la membrane plasmique comme protéines solubles. Weixel et Bradbury ont montré, par des expériences de pull-down, que CFTR se liait par son C-terminal à la protéine AP-2 mais pas à la protéine AP-1 (Weixel et Bradbury, 2000). L'internalisation du canal est perturbée par l'inhibition de l'interaction entre CFTR et le complexe AP-2, ou encore, par le fait de masquer le site de fixation de CFTR sur la myosine VI (Weixel *et al.*, 2000, 2001 ; Cheng *et al.*, 2004 ; Gentzsch *et al.*, 2004). Les protéines internalisées dans des vésicules sont soit recyclées à la membrane plasmique soit adressées à la voie de dégradation lysosomale. Les protéines qui sont recyclées sont transportées vers le compartiment des endosomes de recyclage (ERC Endosomal Recycling Compartment) (Mukherjee *et al.*, 1997). Picciano *et al.* ont montré que CFTR entre dans ce compartiment et est recyclée à la membrane plasmique (Picciano *et al.*, 2003). Ce phénomène de recyclage est absolument nécessaire afin de pallier à l'internalisation constitutive et d'augmenter le séjour de CFTR à la membrane ($T_{1/2}=14$ à 18h) (Swiatecka-Urban *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 2004). Gentzsch *et al.* ont montré que la surexpression de Rme-1 et Rab11 induisait l'accumulation de CFTR dans les endosomes, suggérant leur rôle dans la régulation de la sortie de CFTR des ERC (Gentzsch *et al.*, 2004).

B. La protéine CFTR-F508del

La délétion d'une phénylalanine en position 508 (F508del) du domaine NBD1 de CFTR (codé par l'exon 10) représente ~70% des mutations observées chez les malades (Kerem *et al.*, 1989). La mutation F508del, appartenant à la classe II, ne modifie pas le cadre de lecture et n'a pas d'effet sur la fixation de l'ATP (Qu *et al.*, 1997). Cependant, il a été démontré aujourd'hui que cette mutation perturbe le repliement post-traductionnel de CFTR et provoque son élimination rapide. En effet, à 37°C, cette mutation est responsable de la rétention de CFTR dans le RE. Ce défaut d'adressage est à l'origine de l'absence de perméabilité aux ions Cl⁻ et de l'instauration, dans la membrane plasmique, d'une perméabilité excessive et non régulée aux ions Na⁺ (Berger et Welsh, 1991).

1- Modifications de la protéine CFTR induites par la mutation F508del.

∞ Modifications topologiques

Les premières études ont montré que la mutation F508del causait une mauvaise conformation structurale du domaine NBD1, exposant ainsi certains motifs, analogues au motif de rétention du RE (KDEL) aux protéines chaperonnes et entraînant la reconnaissance de la protéine CFTR mutée par le ERQC (Endoplasmic Reticulum Quality Control), son blocage au niveau du RE et sa dégradation rapide (Gelman *et al.*, 2002). Mais, de récentes études ont suggéré que la délétion du résidu F508 n'avait qu'un effet local sur le repliement du NBD1. En effet, cette mutation n'engendre pas de modification de la structure globale du NBD1, obtenue par rayon γ , sur des NBD1 purifiés (Lewis *et al.*, 2005), et n'altère pas le profil protéolytique (Du *et al.*, 2005). Du *et al.* ont montré que la mutation F508del altère la stabilité du NBD2, probablement par un défaut d'interaction avec NBD1 (Du *et al.*, 2005).

L'acide aminé manquant F508 est probablement impliqué dans des interactions hydrophobes qui sont critiques pour le repliement globale de la protéine (Strickland *et al.*, 1997), pour la mise en place des hélices transmembranaires (Chen *et al.*, 2004), et sert ainsi de signal de reconnaissance pour le système ERAD (ER associated Degradation). L'exposition du motif réticulaire RXR (Chang *et al.*, 1999), ainsi que le fait de masquer le signal d'export di-acidique (Wang *et al.*, 2004), pourrait contribuer à la rétention de la protéine mutée au sein du RE puis à sa dégradation. Allant dans ce sens, la mutation de quatre résidus arginine : R29, R516, R555 et R766 provoque l'adressage d'un tiers des protéines CFTR-F508del à la membrane plasmique où elles sont fonctionnelles (Chang *et al.*, 1999).

∞ Modifications fonctionnelles

Les études menées dans des cellules de mammifères exprimant la protéine CFTR-F508del de manière endogène montrent des modifications fonctionnelles comme le temps de fermeture du canal plus long.

Dans les cellules mucoviscidosiques, lorsque CFTR-F508del est restaurée à la membrane plasmique à l'aide de chaperonnes chimiques, il a été montré que la protéine présentait un défaut d'ouverture du canal (Sato *et al.*, 1996). Des mesures de patch clamp réalisées en configuration cellule attachée, ont montré une réduction de la probabilité d'ouverture et une augmentation du temps de fermeture (Haws *et al.*, 1996 ; Hwang *et al.*, 1997). Plus récemment, des expériences de patch clamp en configuration membrane excisée ont montré que le canal CFTR-F508del présente un taux d'activation, après phosphorylation, sept fois plus faible que celui de CFTR sauvage (Wang *et al.*, 2000).

2- Localisation de la protéine CFTR-F508del

Les premières expériences menées sur la localisation de la protéine CFTR-F508del, par immunofluorescence, ont montré qu'elle n'est pas localisée à la membrane plasmique comme la protéine sauvage, mais dans un compartiment péri-nucléaire (Cheng *et al.*, 1990). De plus en utilisant des cellules COS transitoirement transfectées soit par CFTR-F508del soit par CFTR sauvage, ils observent que CFTR-F508del n'atteint pas la membrane plasmique, ce qui suggère qu'elle ne transite pas par l'appareil de Golgi. Par microscopie électronique, Yang *et al.*, (1993) montrent que le compartiment où CFTR-F508del reste bloquée est le RE (**Figure H21**). Cette observation a été confirmée par d'autres équipes (Lukacs *et al.*, 1994 ; Ward et Kopito, 1994). La protéine CFTR-F508del est bloquée sous sa forme immature, dans une mauvaise conformation au niveau du RE, puis dégradée rapidement à 99% (Ward et Kopito, 1994).

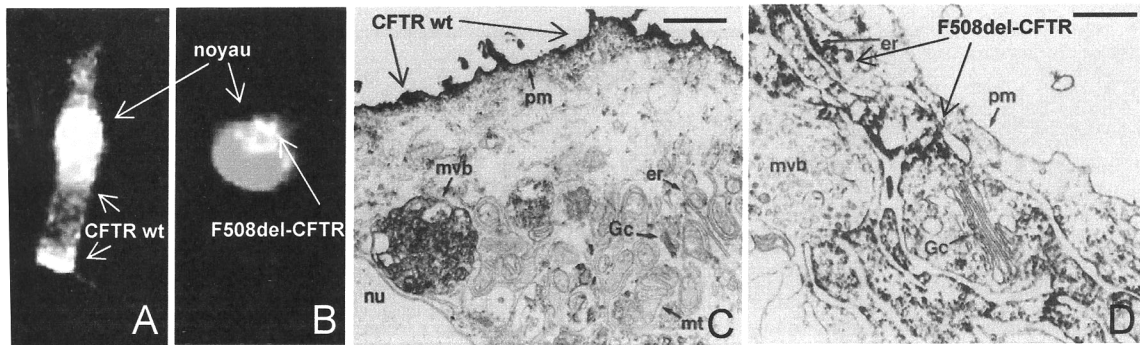


Figure H21: Localisation des protéines CFTR sauvage (A et C) et CFTR-F508del (B et D)

A-B: images en microscopie confocale de cellules brossées nasales humaines issus de patients sains (A) et atteints de mucoviscidose (B). La protéine CFTR est visualisée en blanc.

C-D: Images en microscopie électronique des cellules CFPAC, Nu : noyau, er : RE, mt : mitochondrie, Gc : appareil de Golgi, mvb : molecular vesicular bodies, ERGIC : ER/golgi Intermediaire Compartment et pm : membrane plasmique. La protéine CFTR est visualisée en noir. Echelles : 1 μ m (C) et 0,5 μ m (D).

Modifiées d'après Dormer et al., 2001 et Yang et al., 1993.

Plus récemment, une étude a montré que la protéine CFTR-F508del était capable d'interagir avec la protéine ERGIC53, protéine marqueur du compartiment ERGIC se situant entre le RE et le *cis*-Golgi (Gilbert *et al.*, 1998), laissant penser qu'une infime partie des protéines CFTR-F508del pourrait échapper au ERQC. Allant dans le même sens, la protéine CFTR-F508del a été localisée au niveau de la membrane plasmique des épithélia respiratoire et intestinal de patients homozygotes pour la mutation, suggérant que le défaut de localisation de la protéine serait tissu spécifique (Kalin *et al.*, 1999). Les mêmes observations ont été réalisées dans les épithelia de souris homozygote pour F508del (Steagall et Drumm, 1999).

3- Voie de biosynthèse de la protéine CFTR-F508del

L'absence de la protéine CFTR-F508del à la membrane plasmique peut provenir soit d'un défaut d'adressage de la protéine, soit d'une instabilité de la protéine CFTR-F508del à la membrane plasmique. Les différentes expériences de chasse métabolique réalisées ont permis de discriminer entre les deux hypothèses. La seule présence de la forme immature de la protéine CFTR-F508del indique qu'elle ne mature pas et, de ce fait, ne sort pas du RE. Il est donc raisonnable de penser qu'il s'agit d'un défaut d'adressage de la protéine CFTR-F508del (Wei *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 2003).

De la même façon que la protéine CFTR sauvage, CFTR-F508del est synthétisée au niveau du RE sous forme d'un précurseur de 140 kDa (forme immature de glycosylation ou

core-glycosylée) (Lukacs *et al.*, 1994). Cette molécule contient une chaîne d'oligosaccharides très riche en mannose, ce qui l'a rend sensible à l'endo H, mais contrairement à la protéine sauvage, elle ne parvient pas à acquérir une résistance à l'endo H (Cheng *et al.*, 1990), suggérant qu'elle ne sort pas du RE (**Figure H22**). Ces résultats démontrent que la mutation F508del interfère avec une étape de maturation de la forme immature au niveau du RE.

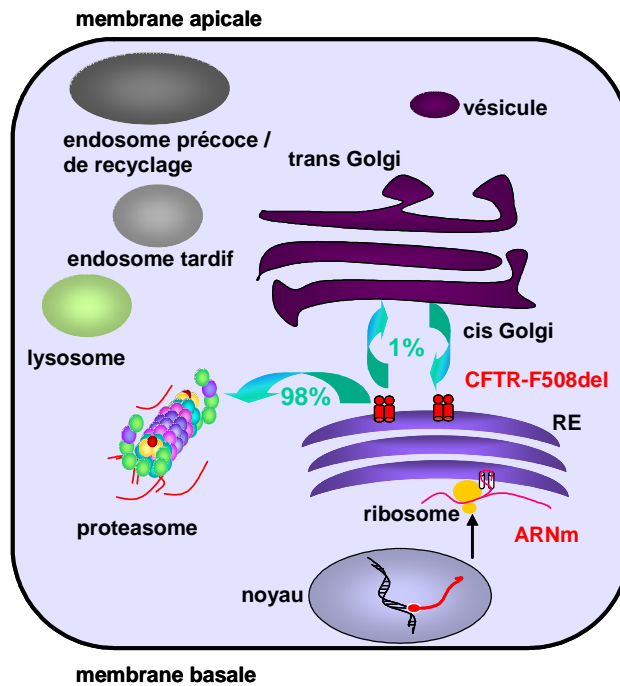


Figure H22: Voie de biosynthèse de la protéine CFTR-F508del

Modifié d'après Lukacs et al., 1994 et Cheng et al., 1990

V/ Systèmes de dégradation des protéines

Les cellules possèdent à la fois des voies de dégradation des protéines extracellulaires et intracellulaires. La principale voie extracellulaire est un système de protéases digestives (endoprotéases, exopeptidases et peptidases) qui digèrent les protéines en oligopeptides, qui sont par la suite transportés à travers la barrière épithéliale intestinale dans le sang. La cellule possède également plusieurs voies protéolytiques intracellulaires pour dégrader les protéines incorrectement repliées ou non assemblées, les protéines normales dont la concentration doit être contrôlée ou qui sont à la fin de leur vie et les protéines étrangères endocytées par la cellule. Ces voies protéolytiques peuvent être classées en deux grands systèmes : les lysosomes et les voies cytosoliques dont la principale est la voie ubiquitine/protéasome.

A. Dégradation des protéines solubles

Les protéines solubles intracellulaires sont en majorité dégradées par des protéases solubles classées en quatre types, basés sur leurs résidus catalytiques et leurs mécanismes d'action (Botion *et al.*, 2001 ; Wolf et Kopan, 2004 ; Schmitz *et al.*, 2004 ; Qui *et al.*, 2004):

- ④ Les sérine/thréonine protéases dont la trypsine, la chymotrypsine, la tripeptidyl peptidase II (TPP II) qui sont inhibées par le PMSF et le MG132.
- ④ Les thiol protéases dont les cystéine protéases, comme les calpaines I et II (voie calcium dépendante), *the Ice Family* impliquée dans l'apoptose, la ER-60 qui est à la fois une chaperonne du RE et une cystéine protéase impliquée dans la dégradation post-traductionnelle de l' apoB100.
- ④ Les aspartyl protéases comme la préséniline
- ④ Les métalloprotéases comme les zinc métalloprotéases.

Les protéines solubles intracellulaires peuvent être également dégradées par la voie ubiquitine/protéasome si elles sont reconnues comme incorrectement repliées ou non assemblées par le système de contrôle de qualité.

B. Dégradation des protéines membranaires

1- Dégradation depuis le RE

La voie ubiquitine/protéasome est responsable de la dégradation de la grande majorité des protéines transmembranaires, en particulier, les protéines anormales, résultant de défauts de synthèse ou de modifications perturbant leur repliement tridimensionnel et par conséquent

leur fonctionnement. Elle utilise l'ubiquitine pour marquer les protéines à dégrader et le protéasome, présent à la fois dans le cytoplasme et le noyau, comme enzyme protéolytique (Hershko et Ciechanover, 1998).

Le ciblage des protéines incorrectement repliées vers la voie ubiquitine/protéasome depuis le RE se fait par deux systèmes successifs : le système de contrôle de qualité du RE (ERQC) et la dégradation associée au ER (ERAD). Ces mécanismes font intervenir de nombreuses chaperonnes et enzymes.

La chaîne α du récepteur T (TCR α) a besoin de s'associer aux six autres chaînes pour quitter le RE (Stafford et Bonifacino, 1991). Cette protéine transmembranaire, si elle n'est pas assemblée avec les six autres sous-unités du récepteur T au niveau du RE, est reconnue comme non assemblée par le ERQC, puis retransloquée dans le cytosol, par le translocon Sec61, avant d'être dégradée par la voie ubiquitine/protéasome (Yu *et al.*, 1997).

☞ Le système contrôle qualité du réticulum endoplasmique

Le RE joue un rôle essentiel dans le repliement et la maturation des protéines nouvellement synthétisées. Il fournit un environnement optimal pour le repliement, l'oxydation et l'assemblage des oligomères des protéines transloquées dans la lumière du RE ou insérées dans la membrane. Le repliement dans le RE se fait par l'action combinée de nombreuses enzymes de repliement, de chaperonnes moléculaires et de senseurs de repliement (Gething et Sambrook, 1992). Ces dernières, pour la plupart, s'associent à la chaîne polypeptidique naissante et aide au repliement tant que la protéine n'a pas acquis son état natif. Afin d'assurer un processus de maturation correct, la sortie du RE est régulée par le système de contrôle qualité du RE (Ellgaard et Helenius, 2001) qui prévient la sécrétion des protéines mal repliées.

Pour la majorité des protéines, le repliement correct, la maturation et l'export dépendent des modifications co- et post-traductionnelles par l'action d'une machinerie moléculaire complexe (**Figure H23**).

Le repliement des protéines est catalysé par des isomérases induisant l'isomérisation *cis-trans* des ponts peptidiques proline (PPIases), des isomérases catalysant la formation des ponts disulfures (PDI, ERp72...), ainsi que par le complexe oligosaccharyltransférase, les glycosidases et les ER mannosidases. Ce système de glycosylation, par addition co-traductionnelle de l'oligosaccharide précurseur Glc₃Man₉GlcNac₂, influence la solubilité, la voie de repliement et l'interaction avec certaines chaperonnes du RE classiques (GRP78,

GRP94) et les chaperonnes appartenant à la famille des lectines (calnexine et calreticuline) (Chevet *et al.*, 2001) (**Tableau HIII**).

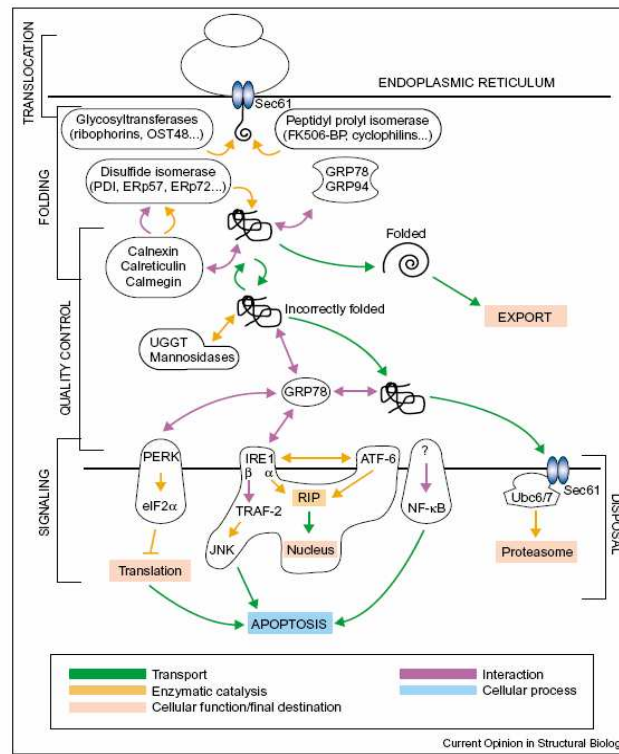


Figure H23: représentation de l'action de la machinerie moléculaire du RE en réponse à un défaut de repliement des protéines.

D'après Chevet et al., 2001

Tableau HIII: Chaperonnes et lectines impliquées dans le ERQC

Famille	Membres	Fonctions
Hsp70	BiP/GRP78, Hsp72, Hsc73, mHsp70	Chaperonne liant les protéines mal repliées empêchant ainsi leur agrégation et aidant au repliement protéique.
Hsp90	GRP94	Chaperonne prévenant l'agrégation
Hsp40	ERdj1-Erdj5, Sec63, Hdj1	Co-chaperonne régulant l'activité ATPase des Hsp70s
Lectines	Calnexine et calreticuline	ERQC
	EDEM	ERAD
Enzymes de glycosylation	UGGT	Ajout de glucose sur les protéines mal repliées prévenant la dissociation de la calnexine
	ER glucosidases I et II	Cycle de la calnexine
	ER mannosidases I et II	ERAD ? et export vers le Golgi
Peptidyl-prolyl isomérases	FK506 binding	Isomérisations des liens <i>cis-trans</i> peptidyl-prolyl
oxydoreductases	PDI, ERp72, ERp57	Formation des ponts disulfures, isomérisation et réduction

Modifié d'après Hartl, 1996 ; Chevet et al., 2001 et Ellgaard et Helenius, 2003

Ces protéines chaperonnes, en interagissant avec les segments hydrophobes exposés de la protéine et les résidus cystéines non liés, préviennent les mauvais repliements en évitant le phénomène d'agrégation et en optimisant ainsi le repliement de la protéine.

Malgré cet environnement idéal, des protéines de conformation incorrecte sont produites dans le RE. Elles ne sont pas transportées le long de la voie sécrétrice, mais sont retenues dans le RE où elles sont, soient prises en charge par les chaperonnes pour acquérir une conformation correcte, soit dirigées vers l'ERAD (Ellgaard et Helenius, 2001).

☞ Le ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation)

Les protéines mal repliées ou non assemblées sont reconnues par les chaperonnes. Elles sont ensuite retransloquées dans le cytoplasme *via* le canal Sec61, déglycosylées et polyubiquitinylées avant d'être dégradées par le protéasome. Ce mécanisme, appelé ERAD, n'est pas un nouveau processus de dégradation intracellulaire puisqu'il utilise, d'une part les chaperonnes, et d'autre part les composants de la voie de dégradation des protéines classiques incluant l'ubiquitine, les enzymes conjuguant l'ubiquitine (Ubc6 et Ubc7), les ubiquitines ligases (Ufd1p) et le protéasome 26S (Plemper *et al.*, 1997), mais aussi d'autres protéines. La protéine multimérique p97 (ou Cdc48p) forme avec Ufd1p et Np14P un complexe protéique se liant à la chaîne polypeptidique en retranslocation et ensuite permet sa polyubiquitination par l'action d'enzymes de conjugaison (E2) et de liaison (E3) de l'ubiquitine. L'hydrolyse complète de l'ATP sur les sites de liaison de l'ATP de p97 est nécessaire pour permettre la retranslocation totale de la protéine à dégrader (Ye *et al.*, 2003).

☞ La voie ubiquitine/protéasome

La voie protéolytique utilisant l'ubiquitine et le protéasome fonctionne en deux grandes étapes: (1) dans un premier temps, le substrat à dégrader est marqué par addition d'une chaîne de polyubiquitine ; (2) dans un deuxième temps, le substrat poly-ubiquitinylé est reconnu et dégradé par le protéasome 26S (**Figure H24**).

(1) Cette voie de dégradation utilise l'ubiquitine, un polypeptide de 76 amino-acides, pour marquer les protéines à dégrader (Hershko et Ciechanover, 1998). Ce marquage se fait par l'attachement covalent de l'ubiquitine à un résidu lysine du substrat, par une cascade enzymatique nécessitant l'action de trois enzymes, appelées E1, E2 et E3. E1 (ubiquitin-activating enzyme) active l'ubiquitine et la transmet à E2 (ubiquitin-carrier protein). Ensuite E2, soit par l'intermédiaire de E3 (ubiquitin-protein ligase), soit avec E3, transfère l'ubiquitine sur le substrat. Cette réaction de conjugaison de l'ubiquitine a lieu plusieurs fois, l'ubiquitine

étant conjuguée à elle-même, ce qui se traduit par l'addition sur le substrat d'une véritable chaîne d'ubiquitines qui sert de signal de dégradation. Alors qu'il existe une forme prédominante de E1 dans les cellules, il existe plusieurs E2s et E3s. La spécificité de cette réaction semble donc venir des E3s, ou bien de la combinaison E2/E3 (Papa et Hochstrasse, 1993 ; Stein *et al.*, 1995).

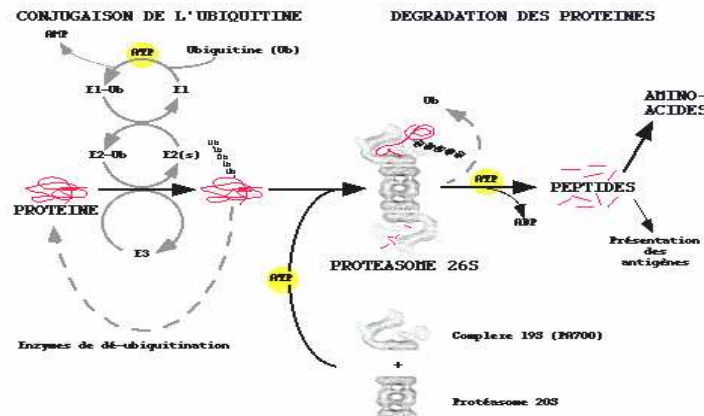


Figure 24: Les deux grandes étapes de la voie de dégradation ubiquitine/protéasome.

(2) Une fois ubiquitinylées, les protéines, reconnues par le protéasome 26S, sont dégradées. Ce complexe, vital pour les cellules, est formé par le protéasome 20S, qui constitue son cœur protéolytique, et deux molécules de PA700 (ou complexe régulateur 19S) qui s'associent, en présence d'ATP, aux extrémités du protéasome 20S (Peters, 1994). Le protéasome 26S dégrade les protéines ubiquitinylées (mais aussi, *in vitro*, certaines protéines non-ubiquitinylées), de manière ATP-dépendante. Ainsi, l'ATP est nécessaire à la fois pour la formation et pour le fonctionnement du protéasome 26S. PA700 contient un groupe d'au moins six ATPases qui confère au protéasome 26S son fonctionnement ATP-dépendant.

Le protéasome 20S (700 kDa) est un complexe multiprotéique, présent dans toutes les cellules eucaryotes et également chez certaines archéobactéries (Dahlmann *et al.*, 1989). Ce cylindre creux, de 4 anneaux heptamériques, est constitué de sous-unités de petite taille α et β (20 à 35kDa). L'analyse par microscopie électronique et par diffraction aux rayons X du complexe de l'archéobactérie *Thermoplasma acidophilum* a permis d'établir de manière détaillée son organisation moléculaire (Puhler *et al.*, 1992 ; Löwe *et al.*, 1995) : chaque complexe est composé de 28 sous-unités, chacun des deux anneaux externes étant constitués par sept sous-unités α , et chacun des deux anneaux internes par sept sous-unités β (**Figure H25**). Le protéasome 20S possède au moins cinq activités peptidasiques, que nous pouvons

identifier à l'aide de substrats peptidiques (Orlowski *et al.*, 1993 ; Löwe *et al.*, 1995 ; Seemuller *et al.*, 1995).

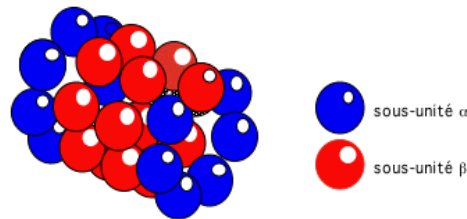


Figure H25: Disposition en cylindre des sous-unités α/β pour former le protéasome 20S

D'après Pulher et al., 1992

2- Dégradation depuis la membrane plasmique

Les protéines situées à la membrane plasmique sont en majorité dégradées par la voie lysosomale. Il s'agit d'une voie ATP-dépendante dégradant des protéines ciblées spécifiquement (séquence KFERK). Les enzymes lysosomales (cathepsines...) sont dépendantes de l'acidité du milieu car elles sont actives à pH 5 (lysosome), mais inactives à pH 7,2 (cytosol). L'acidité des lysosomes est due à la présence d'une pompe à proton (H^+ /ATPase), sensible à la bafilomycine, qui crée un gradient de proton entre les lysosomes et le cytosol (**Figure H26**).

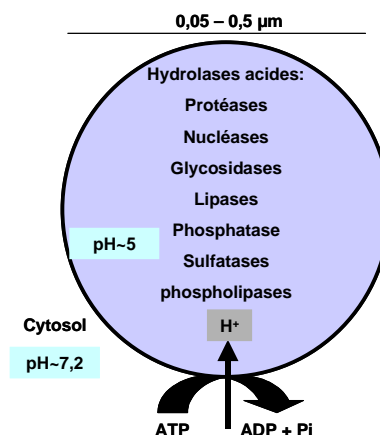


Figure H26: Schéma d'un lysosome, avec sa pompe à proton et ses enzymes dépendantes de l'acidité

Il existe quatre différents types d'acheminement, vers les lysosomes, des molécules à dégrader : (i) l'endocytose médiée par des récepteurs (ERM), (ii) la pinocytose, (iii) la phagocytose et (iv) l'autophagie. Les protéines membranaires sont acheminées, vers les lysosomes, par le phénomène d'endocytose médiée par les récepteurs au niveau des puits

recouverts. Les récepteurs se lient à la clathrine *via* l'adaptine (AP) pour former des macromolécules spécifiques. Par la suite les vésicules ainsi formées vont se dénuder, c'est à dire perdre le manteau de clathrine, puis fusionner avec les endosomes. Le pH légèrement acide de ces derniers favorise la dissociation des récepteurs et des protéines à dégrader. Les récepteurs sont ensuite recyclés à la membrane, alors que les protéines sont ciblées aux lysosomes (**Figure H27**).

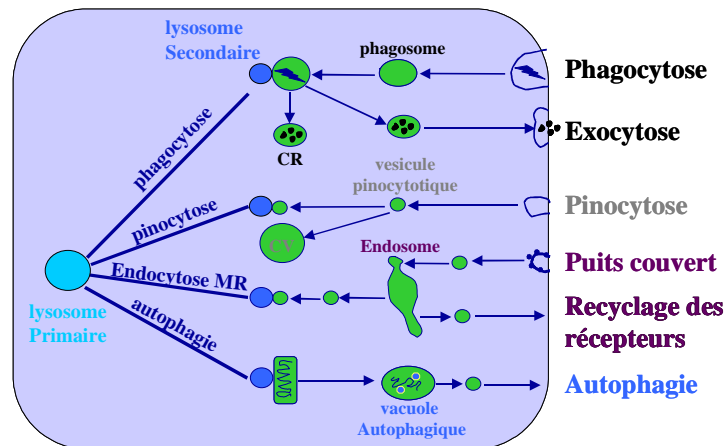


Figure H27: Voies d'acheminement aux lysosomes primaires des molécules à dégrader.
CR : corps résiduel - CV : corps vésiculaire - Endocytose MR : endocytose médiée par les récepteurs

Nous avons vu précédemment que les protéines incorrectement repliées étaient dégradées par la voie ubiquitine/protéasome depuis le RE. Cependant de nombreux exemples montrent que le ERQC est loin d'être sans faille. Certaines protéines peuvent échapper à la rétention du RE causant des maladies comme la mucoviscidose et la déficience en inhibiteur de l'alpha 1-protéase (Thomas *et al.*, 1995 ; Zielenski et tsui, 1995 ; Aridor et Balch, 1999 ; Schwartz et Ciechanover, 1999). La protéine mutée CFTR-T70 est, par exemple, dégradée par la voie ubiquitine/protéasome depuis la membrane plasmique (Benharouga *et al.*, 2001).

3- Dégradation depuis l'appareil de Golgi

Dans les cellules des mammifères, la protéine furine agrégée, le mutant de la connexine 32, la protéine du coronavirus E1 sont destinés à la dégradation lysosomale depuis l'appareil de Golgi sans avoir atteint la membrane plasmique (Armstrong *et al.*, 1990 ; Wolins *et al.*, 1997 ; VanSlyke *et al.*, 2000). Il semblerait qu'un contrôle de qualité post-RE soit responsable du ciblage et de la dégradation des protéines mutantes ayant échappé au ERQC.

VI/ Dégradation des protéines CFTR

A. Rôle des principales protéines chaperonnes dans la biosynthèse de CFTR

La machinerie du ERQC se compose de deux groupes de protéines : les chaperonnes moléculaires et les enzymes de modifications des glycanes. Malgré tout le mécanisme de discrimination entre une protéine incorrectement repliée et une protéine de conformation correcte reste peu précis. La protéine CFTR en cours de synthèse se fixe à différentes chaperonnes moléculaires cytosoliques et résidentes du RE aussi bien qu'à des enzymes du système ERAD durant son repliement co- et post-traductionnel (Pind *et al.*, 1994 ; Loo *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2001 ; Ahner et Brodsky., 2004).

Des complexes formés de chaperonnes primaires et secondaires aussi appelées co-chaperonnes protègent non seulement la protéine CFTR du phénomène d'agrégation mais facilitent aussi le repliement et la dégradation des protéines non natives (Meacham *et al.*, 2001).

1- Rôle des chaperonnes moléculaires

Il a été montré que la forme immature de CFTR s'associe d'une façon réversible avec les chaperonnes Hsp70 et Hsp90 mais également avec le complexe Hsc70 (Heat Shock Cognate, la forme constitutive de Hsp70), alors qu'aucune interaction n'a été détectée avec la forme mature de CFTR. Ce mode d'interaction est spécifique des protéines nouvellement synthétisées (Yang *et al.*, 1993 ; Loo *et al.*, 1998, Youker *et al.*, 2004). Parmi les chaperonnes résidentes du RE, seule la calnexine est connue pour interagir avec CFTR (Pind *et al.*, 1994). Comme pour Hsp70, la calnexine n'interagit que transitoirement et uniquement avec la forme immature de CFTR (Figure H28).

La famille des protéines Hsp70, qui comprend notamment la chaperonne BiP (Binding Ig Protein ou GRP78 pour Glucose Regulated Protein), est constituée de protéines d'environ 70kDa inductibles par un stress thermique. Ces chaperonnes se retrouvent dans tous les organismes, de la bactérie au mammifère en passant par la levure. Elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires et en particulier dans la mise en conformation des protéines incorrectement repliées ou agrégées. Ces protéines interagissent avec les segments hydrophobes et utilisent des mécanismes ATP-dépendants pour stabiliser et favoriser le

repliement des protéines en cours de synthèse. La liaison et l'hydrolyse de l'ATP au niveau des chaperonnes sont contrôlées par des co-chaperonnes de la famille Hsp40, protéines à domaine J comme DnaJ d'*Escherichia coli*, Ydj1 de *Saccharomyces cerevisiae* et les homologues humains Hdj-1 et Hdj-2 (Hartl, 1996).

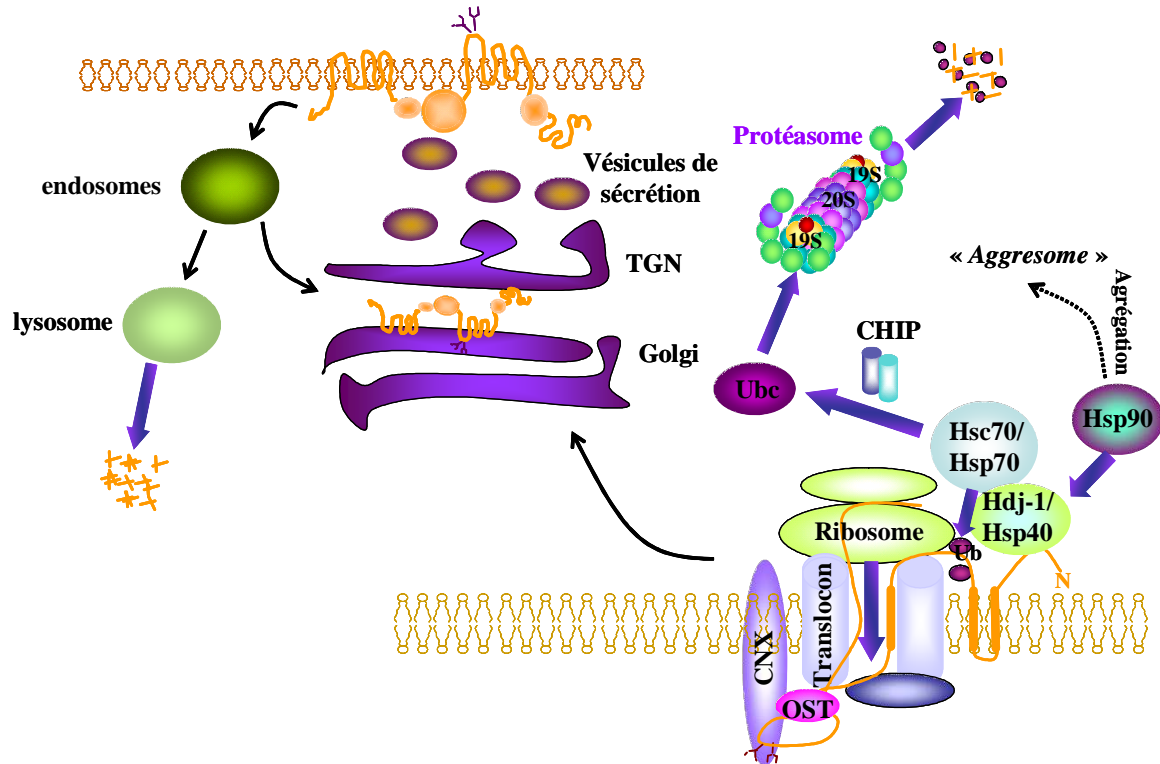


Figure H28: Principales chaperonnes impliquées dans le ERQC.

Hsp : « Heat shock protein », protéine inducible par un stress thermique,

Hsc : « Heat shock cognate », forme constitutive des Hsp,

OST : oligosaccharyl-transferase

Ub : ubiquitine - Ubc : Ubiquitine conjugating enzyme (E2)

CHIP : « C-terminus of Hsc70 Interacting Protein », protéine se fixant au C-terminal de Hsc70.

Modifié d'après Farinha et al., 2002

Les Hsp70 sont structurellement divisées en un domaine ATPase N-terminal de 45kDa, suivi d'une portion de 18kDa permettant de se lier au segment hydrophobe et d'un segment de 10kDa plus variable. Les Hsp40 sont des protéines d'environ 40kDa. Toutes les Hsp40 contiennent un domaine J de 70 acides aminés en N-terminal, qui leur permet d'interagir avec les Hsp70 via un tripeptide HPN. De subtiles différences structurales entre les domaines J des diverses Hsp40 sont critiques pour l'interaction avec les Hsp70. La région centrale des Hsp40 ainsi qu'une partie du C-terminal participe à la liaison du polypeptide en cours de synthèse prévenant ainsi l'agrégation des protéines (Figure H29).

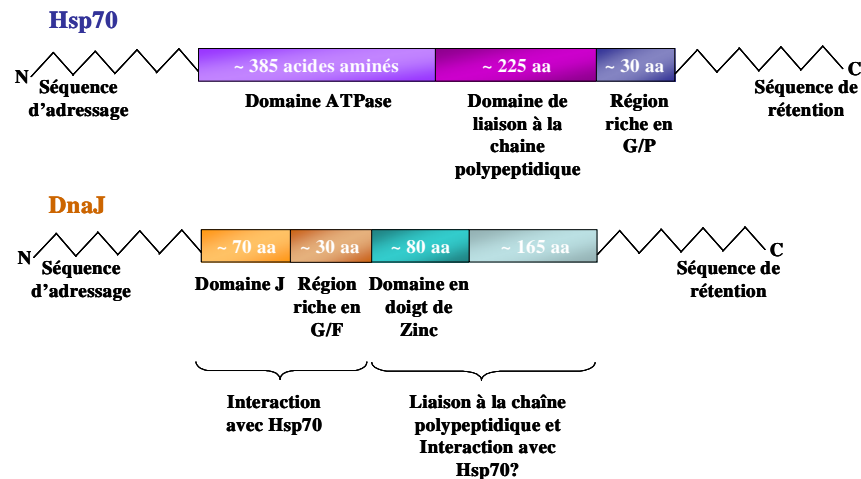


Figure H29: Domaines structuraux de la chaperonne Hsp70 et de sa co-chaperonne bactérienne, DnaJ partageant un fort pourcentage d'homologie avec son homologue humain, Hdj-1.

D'après Hartl, 1996

Les premières expériences menées par Yang *et al.*, *in vivo*, ont mis en avant l'interaction de la forme immature à la fois de CFTR sauvage et de CFTR-F508del, avec Hsp70, mais pas avec BiP. Ces observations suggèrent que Hsp70 serait impliquée dans la discrimination des deux formes. Le complexe se dissocie quand CFTR est exportée vers le Golgi (Yang *et al.*, 1993).

Les expériences qui ont suivi ont été réalisées *in vitro* afin de déterminer la portion de CFTR interagissant avec Hsp70. L'interaction entre le domaine NBD1 de CFTR et Hsc70 augmente l'efficacité de repliement du domaine et inhibe la formation d'agrégat (Strickland *et al.*, 1997). Hsc70 agit avec sa co-chaperonne Hdj-2. Cette dernière, localisée au niveau de la face cytosolique du RE, recrute Hsc70 pour se lier au ribosome et ainsi interagir avec la chaîne polypeptidique naissante (Meacham *et al.*, 1999). Le complexe Hsc70/Hdj-2, très présent au moment où NBD1 est exprimé dans le cytosol mais très réduit après l'expression du domaine R, interagirait avec CFTR au niveau du domaine NBD1 afin d'empêcher son agrégation et de faciliter la voie de repliement amenant à la formation d'un complexe intramoléculaire entre les domaines NBDs et R de CFTR. Ces expériences ont permis de déterminer que le couple Hsc70/Hdj-2 facilite la biosynthèse et le repliement des protéines membranaires possédant de larges domaines cytoplasmiques comme CFTR (Strickland *et al.*, 1997 ; Meacham *et al.*, 1999).

In vivo, la co-transfection de Hsp70 et de Hdj-1 stabilise la forme immature de la protéine CFTR sauvage mais pas de CFTR-F508del suggérant que ce complexe joue un rôle dans la mise en conformation de CFTR sauvage (Farinha *et al.*, 2002). De même, l'expression

exogène de Hdj-2 stabilise le repliement et la maturation de la protéine CFTR (Zhang *et al.*, 2006). Cependant la surexpression, *in vivo*, de Hsp70 en comparaison avec un homologue de Hsp40 (Ydj-1p et Hj1p) augmente l'activité du système ERAD chez la levure en facilitant l'hydrolyse de l'ATP fixé sur Hsp70 (Youker *et al.*, 2004).

La chaperonne Hsp70 forme avec d'autres chaperonnes et co-chaperonnes, dont Hsp40, un complexe multimérique qui joue donc un rôle central dans la détermination du devenir de la protéine CFTR vers la voie de sécrétion ou la voie de dégradation. Les co-chaperonnes identifiées à ce jour sont les Hsp40s, Hdj-1 et Hdj-2, la protéine CHIP (C-terminus of Hsc70 Interacting Protein), la protéine BAG-1 (Bcl-2-associated Anti-death Gene 1) et la protéine HspBP1 (Heat shock protein Binding Protein 1). Le rôle de ces trois co-chaperonnes sera explicité dans le paragraphe VI/C/2 (Figure H30).

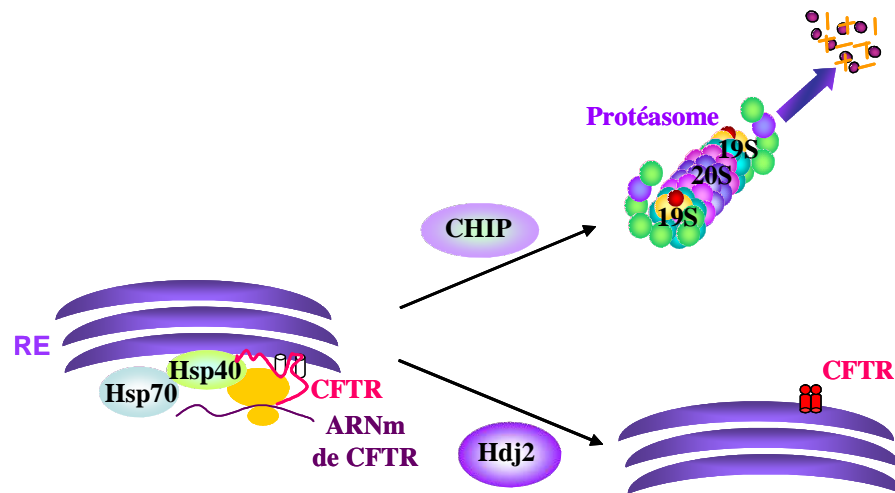


Figure H30: Influence des co-chaperonnes du complexe Hsp70/Hsp40 sur le devenir de la protéine CFTR sauvage.

Hsp : « *Heat shock protein* », protéine inductible par un stress thermique,

Hdj2 : « *Human DnaJ2* », homologue humain de la protéine DnaJ2,

CHIP : « *C-terminus of Hsc70 Interacting Protein* », protéine se fixant au C-terminal de Hsc70.

Une autre co-chaperonne, Csp (Cystein string protein), a été décrite pour interagir avec CFTR *via* Hsc70. Elle participe à la régulation du transport et de la maturation de CFTR. En effet, il a été montré que la protéine Csp est co-localisée avec la protéine CFTR au niveau de la membrane cellulaire et réticulaire des cellules polarisées, et leur co-expression bloque d'une manière dose-dépendante la maturation de CFTR (forme C) tout en augmentant la quantité de la forme B. L'interaction physique de Csp avec CFTR immature suggère que l'altération de l'activité de Csp peut représenter un nouveau niveau de régulation de la voie de biosynthèse de la protéine CFTR dans le RE (Zhang *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré, *in vitro*, que Csp a l'effet inverse de Hdj-2 sur la stabilisation de la forme B de CFTR. Toutes

deux entrent en compétition pour se lier aux domaines R de manière indépendante de Hsp70. Elles agiraient donc comme des chaperonnes à part entière (Zhang *et al.*, 2006).

Les membres de la famille Hsp90 jouent un rôle essentiel dans la prévention de l'agrégation des protéines et la dégradation des protéines (Buchner *et al.*, 1996). Ces chaperonnes dont le poids moléculaire avoisine les 90kDa sont des agents stabilisateurs des protéines de conformation instable (Schneider *et al.*, 1996). Il est donc logique que CFTR interagisse avec Hsp90. Loo *et al.* ont montré d'une part, que seule Hsp90 lie les chaînes naissantes de CFTR sauvage et CFTR-F508del et, d'autre part, que l'inhibition de l'activité de la Hsp90 par la geldanamycine bloque la maturation de la protéine CFTR et accélère la vitesse de dégradation de la forme immature par la protéasome (Loo *et al.*, 1998). Hsp90 possède aussi des co-chaperonnes comme la P23 et Aha-1 qui seront présentées dans le paragraphe **VI/C/2**. De même, l'inactivation dans la levure des homologues de Hsp90 perturbe la stabilité de CFTR, ce qui appuie le fait que Hsp90 préserve CFTR dans un état replié en maintenant le domaine NBD1, sujet à l'agrégation, soluble.

2- Rôle de la calnexine dans la biosynthèse de CFTR

Le couplage entre le repliement et le ERQC a lieu immédiatement après le transport de la protéine en cours de synthèse dans la lumière du RE *via* le translocon. La modification la plus commune est le transfert de l'oligosaccharide précurseur (GlcNAc₂Man₉Glc₃) sur la chaîne polypeptidique croissante. Pour les glycoprotéines, le ERQC implique deux lectines homologues résidentes du RE : une protéine transmembranaire, la calnexine (CNX), et une protéine soluble, la calréticuline (CRT). Ces dernières interagissent avec les glycannes N-liés monoglucosylés (GlcNAc₂Man₉Glc) après élagage du cœur oligosaccharidique, par l'action de l' α 1,2-glucosidase I (**Figure H31, 2**) (Hammond *et al.*, 1994 ; Ware *et al.*, 1995 ; Hebert *et al.*, 1995 ; Bergeron *et al.*, 1998).

La CNX possède un domaine lectine pour lier le glycanne et une boucle distincte impliquée dans l'interaction directe protéine-protéine (Schrag *et al.*, 2001). Cette chaperonne fixe également de l'ATP, du Ca²⁺, du Zn²⁺ et interagit avec la co-chaperonne ERp57. Cette dernière est une thiol oxydoréductase de la famille des disulfide isomérases (PDI) (Ellgaard et Helenius, 2001), en charge de la formation des ponts disulfures (Oliver *et al.*, 1997). L'association entre le substrat glycoprotéique, les lectines et la co-chaperonne se termine par l'action de l' α 1,3-glucosidase II (**Figure H31, 3**), qui enlève le dernier résidu glucose du

glycane. Si, à ce moment, la glycoprotéine a atteint sa conformation native, elle n'est pas retenue dans le RE et est transportée vers l'appareil de Golgi pour achever sa maturation. Si ce n'est pas le cas, un résidu glucose est ajouté sur le N-glycane par l'action de l'UDP-glucose glucosyltransférase (UGGT) (Parodi, 2000), ce qui permet, à nouveau, la liaison de la calnexine et l'entrée de la glycoprotéine dans une voie de repliement appelée le cycle de la CNX (Wada *et al.*, 1997 ; Zapun *et al.*, 1998).

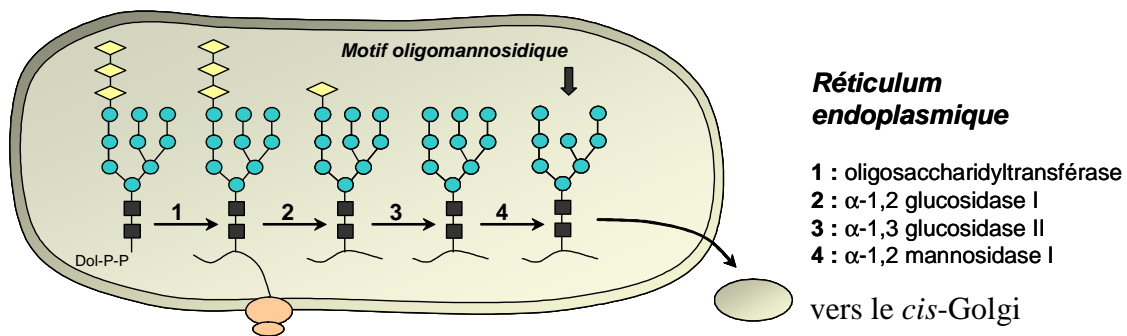


Figure H31: La biosynthèse des N-glycannes au sein du RE.

La glycosylation est une modification co- et post-traductionnelle qui se déroule dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, où de nombreuses enzymes de la glycosylation interviennent. Les carrés noirs représentent les résidus N-acétylglucosamine, les ronds bleus les résidus mannose, les losanges jaunes les résidus de glucose.

Ce contrôle qualité continue jusqu'à ce que les glycoprotéines acquièrent leur structure native pour être transportées vers le Golgi ou bien jusqu'à ce qu'elles soient « étiquetées » pour être ensuite dégradées (**Figure H32**).

La CNX, la glucosidase II, l'UGGT, Erp57 et EDEM (ER-Degradation Enhancing α -Mannosidase-like protein) forment un complexe augmentant l'efficacité de repliement et prévenant l'export d'une protéine mal repliée et une oligomérisation prématurée.

Le mode d'interaction de la CNX avec les protéines nouvellement synthétisées, de même que l'interaction de la CNX avec une protéine CFTR sauvage ayant une conformation intermédiaire, restent encore mal définis. Des études ont montré que la CNX était transitoirement associée à la forme immature de CFTR sauvage, alors qu'elle restait associée avec CFTR-F508del jusqu'à la dégradation par le système ERAD (Pind *et al.*, 1994 ; Ward et Kopito, 1994). D'autres travaux révèlent que la mutation des asparagines de CFTR, ou que l'ajout de castanospermine, un inhibiteur de glucosidases, qui prévient l'association entre la CNX et les glycoprotéines, n'ont pas d'effet sur la maturation de CFTR sauvage (Loo *et al.*, 1998). Ces résultats contradictoires pourraient voir leur origine dans le choix du modèle cellulaire. En effet une étude menée sur les cellules immortalisées d'un épithélium respiratoire

a montré que, en présence de castanospermine, la vitesse de dégradation de CFTR-F508del augmente ainsi que celle de CFTR sauvage mais de manière moins importante (Wei *et al.*, 1996) alors que dans les cellules CF15, le miglustat (un inhibiteur de l' α -1,2-glucosidase) restaure un CFTR-F508del mature et fonctionnel à la membrane apicale en empêchant l'interaction entre CFTR-F508del et la CNX (Norez *et al.*, 2006).

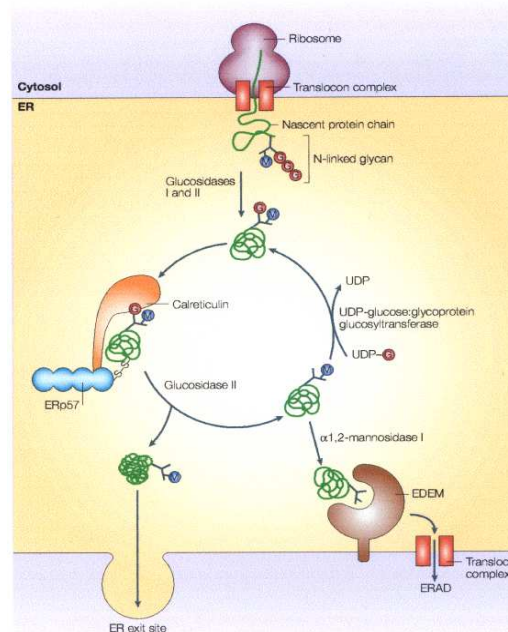


Figure H32: Cycle de la calnexine et de la calréticuline au sein du ERQC

D'après Ellgaard et helenius, 2003

B. Implication de l'ERAD dans la dégradation de CFTR

1- Signal de sortie du cycle de la calnexine

Différentes chaperonnes du RE semblent impliquées dans le système ERAD incluant la CNX et la protéine BiP (McCracken et Brodsky, 2003). Les glycoprotéines de conformation incorrecte sont retenues par la CNX au niveau du RE, et en cas de repliement incorrect sont dirigées vers le système ERAD. Les enzymes clés du cycle de la CNX qui agissent comme des senseurs de repliement sont l' α 1,2-glucosidase II et l'UGGT, deux enzymes de modifications des glycannes. L'UGGT reconnaît spécifiquement les glycannes des protéines mal repliées (Ritter et Helenius, 2000) en se liant aux éléments peptidiques hydrophobes proches des glycannes alors que la glycoprotéine est sous forme Molten Globule, c'est-à-dire possédant une structure secondaire mais pas tertiaire (Sousa et Parodi, 1995 ; Caramelo, 2003). Les protéines incorrectement ou non complètement repliées sont

reglucosylées par l'UGGT (Suh *et al.*, 1992 ; Parodi, 2000) et de ce fait de nouveau ciblées à la CNX. Ce cycle continue jusqu'à ce que la protéine ait atteint sa conformation native ou soit ciblée à la dégradation. Ce ciblage peut avoir lieu seulement si la protéine sort du cycle de reglucosylation. Le retrait du mannose de la branche centrale de l'oligosaccharide au cours de l'interaction avec la CNX par la α 1,2-mannosidase du RE mène à l'association de la glycoprotéine à l'EDEM (**Figure H31, 4**) et correspond au signal de sortie de la protéine du cycle (**Figure H32**). Le motif Man8GlcNac2 semble donc être le signal de dégradation (Jakob *et al.*, 2001). Des travaux ont reporté que la lectine EDEM régulaient la rétention dans le RE des glycoprotéines ayant une conformation incorrecte (Molinari *et al.*, 2003). La surexpression de EDEM, dans les cellules de mammifères, entraîne une activité croissante du système ERAD tandis que l'inhibition de l' α mannosidase I par la kifunensine ralentit la dégradation (Hosokawa *et al.*, 2001). L'EDEM semble donc être à l'interface du cycle de la CNX et de l'ERAD.

2- Autres protéines chaperonnes impliquées dans le système ERAD

Les Hsp sont aussi impliquées dans l'envoi des protéines de conformation incorrecte vers le système ERAD. En effet les Hsp ne sont pas seulement impliquées dans le repliement des protéines comme CFTR mais interviennent aussi dans le ciblage vers la dégradation.

En effet, les chaperonnes Hsp70 et Hsp90 facilitent le recrutement d'un complexe de chaperonnes qui entraîne la dégradation des protéines *via* le protéasome, après leur ubiquitination. Ce complexe comprend, entre autres, la protéine CHIP E3 ubiquitine ligase de 35kDa qui confère aux chaperonnes moléculaires un rôle de facteur de dégradation protéique, altérant ainsi la balance entre le repliement et la dégradation pendant la voie de régulation médiée par Hsp70 et Hsp90 (Nikolay *et al.*, 2004 ; Meacham *et al.*, 2001 ; Younger *et al.*, 2004). CHIP possède un domaine U-box (ou domaine RING) reconnue par la E2 UbcH5 formant un complexe de polyubiquitination qui participe à l'attachement de la polyubiquitine sur la protéine complexée à Hsp70, ciblant ainsi le complexe au protéasome. La protéine CHIP co-localise partiellement avec Hsp70 et CFTR dans le RE et sa surexpression augmente la dégradation des protéines CFTR ubiquitinylées (Meacham *et al.*, 2001). L'équipe de Lenk a démontré que les orthologues humains de Ubc5/Ubc6, enzymes combinées à l'ubiquitine ligase (E3), ainsi que le facteur Derlin-1, possédant quatre hélices transmembranaires, formeraient un pore d'export, (Lilley et Ploegh, 2004 ; Ye *et al.*, 2004) et semblent coopérer

avec CHIP. Cette interaction serait un pré-requis pour le ciblage de la protéine CFTR non native à la dégradation par le protéasome (Meacham *et al.*, 2001 ; Lenk *et al.*, 2002).

Afin de cibler CFTR au protéasome, CHIP coopère avec une autre co-chaperonne de Hsc70 : BAG-1. Elles interagissent simultanément avec Hsc70, BAG-1 avec le domaine ATPase en N-terminal et CHIP avec le C-terminal (Alberti *et al.*, 2002). BAG-1 est impliquée dans la régulation de la liaison ATP-dépendante entre CFTR et Hsc70 et déclenche le départ de Hsc70 par échange nucléotidique (Sondermann *et al.*, 2001). BAG-1 peut s'associer au protéasome *via* un domaine Ub-like ce qui lui permet de recruter et de cibler au protéasome les protéines liées à Hsp70.

Une co-chaperonne de la fonction Hsc70/CHIP est HspBP1. Cette dernière, en interagissant avec le domaine ATPase N-terminal d'Hsc70 agit comme un facteur de relarguage nucléotidique ce qui a pour effet d'inhiber CHIP liée à Hsc70. HspBP1 interfère avec la dégradation de CFTR immature et stimule sa maturation (Alberti *et al.*, 2004 ; Younger *et al.*, 2004).

HspBP1 n'est pas le seul co-facteur ayant un effet inhibiteur de l'activité ubiquitine-ligase de CHIP, un second co-facteur, BAG-2 a été décrit comme inhibant cette activité ligase, empêchant l'interaction entre CHIP et E2 UbcH5 (Arndt *et al.*, 2005).

L'existence de toutes ces co-chaperonnes permet d'expliquer le fait que de nombreuses équipent trouvent que Hsp70 puisse promouvoir soit la dégradation soit la maturation de CFTR.

Le retranslocation de la protéine CFTR ubiquitinylée vers le cytoplasme *via* le translocon est elle aussi assistée par différentes chaperonnes. Le complexe protéique cytosolique AAA-ATPase (ATPase Associated with various cellular Activities) est impliqué dans la dégradation des protéines incorrectement repliées par le système ERAD. Il comprend deux ATPases : RC (Regulatory Complex) qui est composé d'un anneau de six sous unités localisé à la base de la sous-unité régulatrice 19S du protéasome (Glickman *et al.*, 1998) et p97 (VCP/cdc48), un homohexamère, qui fonctionne en collaboration avec deux co-facteurs Ufd1 et Npl4 (Bays et Hampton, 2002). Ces deux ATPases, associées au protéasome 20S, lient directement les protéines polyubiquitinylées et facilitent la dégradation des substrats du RE et du cytoplasme (Dai *et al.*, 1998 ; Bays et Hampton, 2002 ; Pickart et Cohen, 2004). La base RC de la sous-unité 19S interagit directement avec la machinerie de translocation Sec61 (Kalies *et al.*, 2005), alors que p97 se lie au RE *via* un large complexe comprenant plusieurs ubiquitine ligase (gp78, Doa10 et Hdr1), VIMP1 (VCP-Interacting Membrane Protein 1),

Derlin-1 et Ubx2 (Lilley et Ploegh, 2004 ; Ye *et al.*, 2004 ; Zhong *et al.*, 2004 ; Neuber *et al.*, 2005 ; Schuberth et Buchberger, 2005). p97 facilite la présentation de la protéine à dégrader au protéasome et augmente le taux et l'efficacité de dégradation des segments transmembranaires. En effet, l'inhibition de ce complexe retarde significativement la dégradation de la protéine CFTR immature (Gnann *et al.*, 2004 ; Carlson *et al.*, 2006) (**Figure H33**).

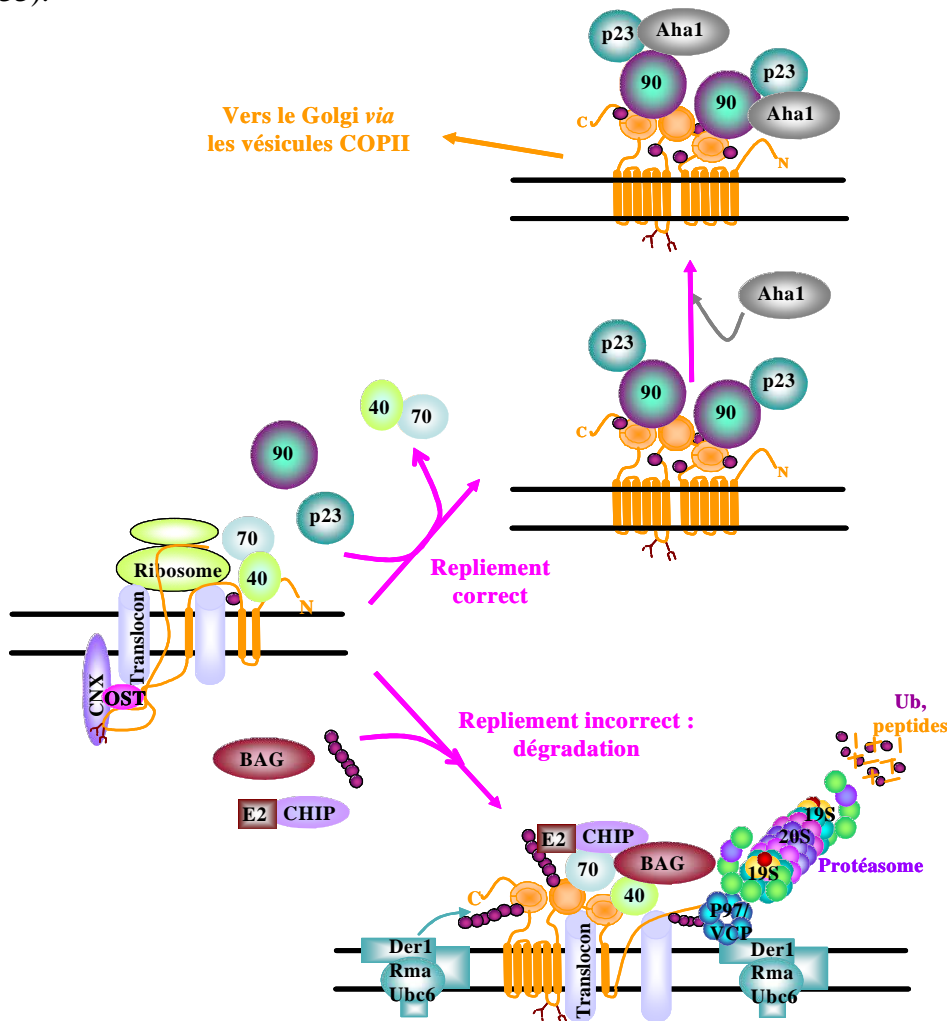


Figure H33: Chaperonnes et repliement de CFTR

Ce modèle montre la voie de repliement associée aux chaperonnes de la protéine CFTR. Durant la synthèse de CFTR, les segments transmembranaires sont intégrés dans la membrane du RE *via* le translocon Sec61, et les différentes chaperonnes cytosoliques ou luminales s'associent à la chaîne polypeptidique naissante. Le cycle de liaison des ATPases Hsp70/40 permet le recrutement de la protéine p23 qui va favoriser la liaison entre Hsp90 et la protéine, facilitant ainsi le repliement de CFTR. L'activité ATPase de Hsp90 est stimulée par Aha1 et le complexe est relâché afin de permettre à la protéine CFTR d'être empaquetée dans les vésicules COPII. L'échec de CFTR à se replier correctement provoque le recrutement de co-facteurs qui favorisent la dégradation. Ce qui se traduit par la polyubiquitinylation de CFTR, son extraction de la membrane et sa dégradation par p97, le protéasome et d'autres composants liés à la membrane ou cytosoliques.

Modifié d'après Skach, 2006

Le rôle de la machinerie de transport entre le RE et le Golgi dans la dégradation de la protéine CFTR est soumis à controverse. En effet les protéines constitutives des vésicules de type COPII (constituées de la GTPase Sar1 ainsi que des complexes Sec23/24 et Sec13/31) impliquées dans le transport ER-ERGIC apparaissent comme impliquées dans un point de contrôle de la maturation de CFTR. Des études menées chez la levure montrent que CFTR est transportée par ce type de vésicules à la sortie du RE vers la voie de dégradation. Cependant la mutation du gène *sec18*, codant pour la protéine Sec18p, nécessaire à la fusion des vésicules COPII avec le Golgi à un effet contestable sur la dégradation de CFTR (Fu et Sztul, 2003). D'autres auteurs contestent ces conclusions en montrant que dans les cellules de mammifères, les protéines CFTR sont effectivement exportées du RE par ce type de vésicule mais pas vers la voie de dégradation (Wang *et al.*, 2004).

C. La dégradation de la protéine CFTR-F508del

Les systèmes UPR (Unfolded Protein Response) et ERAD représentent deux voies d'élimination de protéine de conformation incorrecte de la voie de sécrétion. Ils se recouvrent partiellement et sont capables de se compenser. En absence d'une réponse UPR fonctionnelle, la capacité du système ERAD est normalement suffisante. Ces observations suggèrent que l'ERQC, l'ERAD et l'UPR sont trois systèmes très liés entre eux (Chevet *et al.*, 2001).

1- La réponse UPR et la protéine CFTR-F508del

La machinerie du système UPR est nécessaire pour une efficacité maximale de dégradation en cas de stress réticulaire. La réponse UPR pourrait jouer un rôle de balance dans le trafic des protéines au niveau du RE pendant les périodes de stress, lorsque l'import des protéines en cours de synthèse et l'export des protéines ciblées à la dégradation sont en concurrence pour la machinerie de translocation.

La réponse UPR chez la levure est bien caractérisée mais il n'en est pas de même dans les cellules de mammifères. Trois composants du réticulum ont été identifiés : la protéine kinase transmembranaire PERK (double-strand RNA-activated Protein kinase-like ER Kinase), la glycoprotéine transmembranaire IRE1p (Inositol-Requiring Enzyme) et le facteur de transcription transmembranaire ATF6 (Activating Transcription Factor) (**Figure H23**).

En se basant sur les similitudes de la signalisation de la réponse induite par l'inhibition de la N-glycosylation, de la réduction des ponts disulfure et la déplétion en calcium du RE, les gènes codant pour la protéine humaine Ire1p (hIre1p) et la protéine

murine Ire1p (mIre1p) ont été caractérisés ; il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire à activité kinase et endoribonucléase. Mais il semblerait que la réponse UPR requière des voies d'activation additionnelles qui produisent des réponses pro- ou anti-apoptotiques (Tirasophon *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1998). Ces auteurs ont observé que la surexpression de la protéine sauvage hIre1p activait de manière constitutive la réponse UPR, alors que la surexpression de la protéine hIre1p déficiente pour son activité kinase, inhibait la réponse UPR. De plus la surexpression de la protéine mIre1p transfectée induit l'apoptose (Wang *et al.*, 1998).

Une deuxième protéine impliquée dans la signalisation en réponse au stress est la protéine réticulaire transmembranaire ATF6. Cette protéine subit une protéolyse sous les conditions de stress du RE générant un fragment cytosolique d'ATF6 qui est retransloqué dans le noyau et agit comme un facteur de transcription (Haze *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2000).

Une troisième protéine est une protéine kinase transmembranaire résidente du RE appelée PERK qui est activée par un stress du RE (Harding *et al.*, 1999 ; Sood *et al.*, 2000). PERK, ainsi activée, phosphoryle la sérine 51 du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor) (Harding *et al.*, 1999) provoquant la diminution de la synthèse protéique.

Différentes études ont montré que l'activation de ces trois protéines est régulée par la chaperonne BiP (Mori *et al.*, 1992 ; Bertolotti *et al.*, 2000 ; Okamura *et al.*, 2000, Urano *et al.*, 2000 ; Shen *et al.*, 2002). Ces études ont montré que BiP interagissait avec Ire1p, ATF6 et PERK pour les maintenir à l'état de monomères inactifs. Lors d'accumulation de protéines de conformation instable dans le RE, BiP relache Ire1 et PERK, entraînant leur oligomérisation puis leur activation (Bertolotti *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2003). PERK phosphoryle eIF2 α sur la S51. La synthèse protéique est alors diminuée. La dissociation de BiP et de ATF6 permet aux sous-unités ATF6a et ATF6b de transiter vers l'appareil de Golgi, où elles sont clivées par des protéases. Les fragments cytosoliques après migration dans le noyau activent la transcription (Zhang *et al.*, 2006). Beaucoup de protéines induites par la réponse UPR sont impliquées dans le repliement, la glycosylation intrinsèque au RE et le transport vésiculaire (Travers *et al.*, 2000) Cette réponse implique la voie de dégradation ubiquitine-protéasome puisqu'elle implique, chez la levure, l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine : Ubc7 ou UbE2G2 chez l'homme (Ng *et al.*, 2000).

La mutation F508del dans la protéine CFTR se caractérise par une rétention dans le RE. L'hypothèse que cette rétention puisse déclencher le processus de stress réticulaire et

induire une réponse UPR est donc plausible. L'association de BiP avec la protéine CFTR n'a pas été démontrée (Yang *et al.*, 1993 ; Pind *et al.*, 1994 ; Loo *et al.*, 1998), ce qui laisse penser qu'il n'y a pas de réponse UPR dans les cellules mucoviscidosiques. De plus, une étude réalisée sur les cellules primaires a permis d'établir qu'il n'existait pas de réponse UPR dans les cellules des voies aériennes des patients mucoviscidosiques (Nanua *et al.*, 2006). Ces auteurs montrent qu'il n'y a pas de différences d'expression protéique du facteur pro-apoptotique CHOP (C/EBP Homologous Protein) ou de la protéine BiP entre les cellules mucoviscidosiques et non mucoviscidosiques. Aucune différence significative n'a été observée au niveau de la phosphorylation de PERK, du facteur eIF2 α , l'épissage de la protéine XBP-1, le substrat de IRE1 (Nanua *et al.*, 2006).

2- Influence des chaperonnes du ERQC sur la rétention et la dégradation de la protéine CFTR-F508del

La reconnaissance des protéines CFTR-F508del comme étant des protéines de conformation incorrecte et leur ciblage à la voie de dégradation, se fait par le système ERQC (voir paragraphe VI/A). Cependant, si nous retrouvons les principales chaperonnes décrites pour la protéine CFTR sauvage, leurs rôles peuvent s'avérer différents en présence de la mutation F508del.

La protéine Hsp90 a été décrite comme interagissant avec les chaînes naissantes de CFTR sauvage et CFTR-F508del. Elle assiste au bon repliement ainsi qu'à la maturation de la protéine nouvellement synthétisée, participant ainsi aux dernières étapes du ERQC. L'utilisation de drogues perturbant l'interaction de la protéine avec la chaperonne, comme la geldanamycine stabilise la protéine CFTR-F508del (Loo *et al.*, 1998). En effet, en prévenant l'interaction de la protéine avec Hsp90, le relarguage de la protéine Hsp70 est favorisé (Fuller et Cuthbert, 2000).

Récemment de nouvelles co-chaperonnes de Hsp90, p23 et Aha1, ont été identifiées plaçant Hsp90 comme un point de décision pour le devenir de CFTR (Wang *et al.*, 2006). La co-chaperonne p23 inhibe l'activité ATPasique de Hsp90, stimule la formation du complexe de repliement comprenant Hsp90 et stabilise la liaison de Hsp90 à la protéine en cours de repliement (Wegele *et al.*, 2004). Les études de Wang (Wang *et al.*, 2006) montrent que la réduction de la quantité de p23, *in vivo*, augmente la dégradation de CFTR-F508del, alors que sa surexpression prévient sa dégradation, mais non sa maturation. Une explication simple est que la réduction de la quantité de p23 empêche le transfert vers Hsp90 et favorise la liaison de

la protéine CFTR immature au complexe Hsp70/Hsp40 et donc sa dégradation. La co-chaperonne Aha1 est un stimulateur de l'activité ATPasique de Hsp90 qui agit comme un co-facteur tardif dans le complexe Hsp90-CFTR-F508del (Wegele *et al.*, 2004). Wang *et al.* (2006) ont montré que la surexpression de Aha1 déstabilise CFTR-F508del, alors que sa sous-expression améliore la stabilité, la maturation et permet la restauration d'un canal CFTR-F508del fonctionnel à la membrane plasmique. La diminution du taux de la protéine Aha1 réduit l'interaction entre la protéine CFTR-F508del et Hsp90. Ces résultats, très surprenant, suggèrent que la protéine Aha1 bloque l'interaction CFTR-F508del-Hsp90 d'une manière très différente de celle de p23 et que son action dépend du moment où le co-facteur Aha1 intervient dans la voie de repliement médiée par Hsp90 (Wang *et al.*, 2006).

La chaperonne Hsp70 semble, quant à elle, impliquée dans le contrôle qualité de CFTR-F508del et sa rapide dégradation. En 1993, l'équipe de Yang a montré que la forme immature des protéines CFTR sauvage et mutée interagissaient avec la chaperonne Hsp70. Le taux de protéines CFTR-F508del associées à Hsp70 diminue en parallèle de la dégradation de CFTR-F508del, laissant penser que Hsp70 est impliquée dans le ciblage de CFTR-F508del au système ERAD (Yang *et al.*, 1993). La chaperonne Hsc70 est connue pour former un complexe avec Hdj-2 ; ce complexe interagit avec CFTR-F508del de manière deux fois plus abondante qu'avec CFTR sauvage (Meacham *et al.*, 1999). Par conséquent CFTR-F508del semble avoir plus de difficulté que CFTR sauvage à parvenir à se replier correctement au cours de sa liaison avec le complexe Hsc70/Hdj-2. Ces observations, allant dans le même sens que celles de Lukacs (Lukacs *et al.*, 1994), laissent penser que CFTR sauvage et CFTR-F508del existent sous une même conformation immature dans les premières étapes de la biosynthèse mais seulement la protéine CFTR sauvage peut se replier correctement et atteindre sa conformation native, ce qui est consistant avec l'existence de deux formes de CFTR sauvage dans le RE : bande B et B' (Zhang *et al.*, 1998). Cette incapacité à se replier, et donc à sortir du ERQC, proviendrait d'un défaut d'interaction entre le NBD1 et le domaine R ou d'autres parties du C-terminal (Meacham *et al.*, 1999). De plus, la sous expression de Hsp70 entraîne le repliement de CFTR-F508del (Rubeinstein *et al.*, 2000 ; Choo-Kang *et al.*, 2001), alors que sa surexpression n'a pas d'effet notable sur la stabilité de CFTR sauvage ou de CFTR-F508del (Farinha *et al.*, 2002). De manière intéressante la surexpression de la co-chaperonne de Hsp70, Hsp40/Hdj-1, qui stimule l'activité de repliement de Hsp70, stabilise la protéine CFTR sauvage mais n'a pas d'effet sur la stabilité de CFTR-F508del (Farinha *et al.*, 2002).

La protéine CFTR-F508del dans son état de repliement instable forme un complexe avec la protéine CHIP *via* son interaction avec le complexe Hsc70/Hsp40. L'interaction entre Hsc70 et CHIP forme une E3 ubiquitine ligase. CHIP va alors interagir avec l'E2 UbcH5a afin de faciliter l'ubiquitination et la dégradation de CFTR-F508del (Younger *et al.*, 2004). Récemment, Younger *et al.* ont montré que la protéine E3 RMA1 du complexe E3 RMA1/E2 Ubc6e/Derlin-1, localisée dans la membrane du RE, semble reconnaître la protéine CFTR-F508del. En effet, la délétion de la phénylalanine en position 508 provoque l'arrêt de la maturation de CFTR dans une conformation incorrecte, reconnue par RAM1. Il semblerait que E3 RAM1 détecte les défauts de repliement de manière co-traductionnelle alors que E3 CHIP les détecte de manière post-traductionnelle. De ce fait RMA1 et CHIP agirait de manière séquentielle au niveau de la membrane du RE et dans le cytosol de façon à contrôler parfaitement le niveau de repliement de la protéine CFTR (**Figure H33**) (Younger *et al.*, 2006). Une autre étude, appuyant le rôle de la voie ubiquitine/protéasome dans la dégradation de CFTR-F508del est l'étude de Johnston qui montre que la surexpression de CFTR-F508del ou l'inhibition du protéasome permet l'accumulation de la protéine sous une forme stable de haut poids moléculaire et multi-ubiquitinylée appelée « aggresome » (Johnston *et al.*, 1998). Cependant, ces observations ont été réalisées dans des conditions artificielles qui ne sont pas présentes dans une cellule où la protéine mutée est exprimée de façon endogène.

Une étude a démontré que la protéine CFTR-F508del interagissait avec la lectine CNX. Cette interaction semble prolongée pour le mutant CFTR-F508del par rapport à CFTR sauvage (Pind *et al.*, 1994). Cependant, il a été récemment décrit que la surexpression de la CNX permettrait la déstabilisation de CFTR-F508del mais pas celle de CFTR sauvage (Farinha *et al.*, 2002). Cette même équipe propose qu'il existerait deux points de contrôle au niveau du RE, dont l'un serait indépendant de la CNX (**Figure H34**) et que ce dernier niveau de contrôle prendrait en charge la protéine CFTR-F508del (Farinha et Amaral, 2005). Cependant, ces travaux ne sont pas en adéquation avec les différentes études montrant une interaction directe entre la protéine CFTR-F508del et la CNX (Pind *et al.*, 1994 ; Egan *et al.*, 2002). Une étude d'Okiyoneda a également montré que une surexpression de la CNX augmente la quantité de CFTR-F508del au niveau du RE (Okiyoneda *et al.*, 2004).

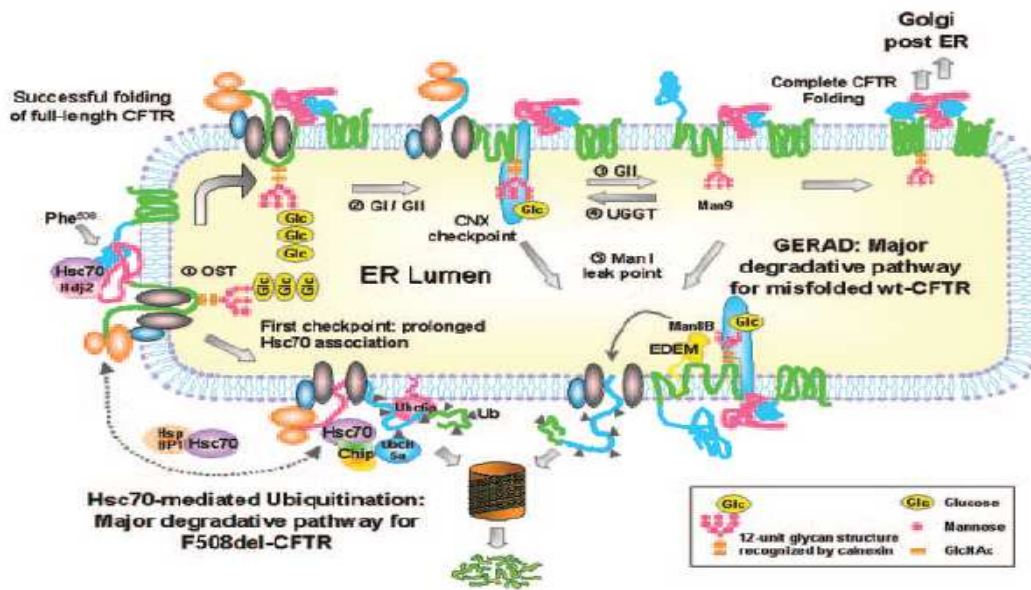


Figure H34: Modèle pour les voies de dégradation majeure des protéines CFTR sauvage et CFTR-F508del

D'après Farinha et Amaral, 2005

A ce jour, il reste à comprendre comment les interactions avec les chaperonnes décident du devenir des protéines CFTR de conformation incorrecte.

D. Voies impliquées dans la dégradation des protéines CFTR

Différentes études ont montré que la voie ubiquitine protéasome est responsable, au moins en partie, de la dégradation co- et post-traductionnelle de la protéine CFTR ubiquitinylée et de conformation incorrecte. Notamment, les équipes de Jensen et Ward ont utilisé des drogues inhibant plus ou moins spécifiquement le protéasome tels que le MG132 ou la lactacystine. Ils ont remarqué que la protéine CFTR, suite à ces traitements se retrouvait sous forme polyubiquitinylée (Jensen *et al.*, 1995 ; Ward *et al.*, 1995 ; Sato *et al.*, 1998 ; Xiong *et al.*, 1999). De plus, ces mêmes auteurs ont démontré que l'ubiquitination n'était pas simplement une conséquence de l'accumulation des protéines lors de l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome, mais bien un pré-requis à la reconnaissance des protéines par le protéasome. La protéine CFTR est ciblée au système ERAD par les chaperonnes (Loo *et al.*, 1998 ; Meacham *et al.*, 1999 ; Meacham *et al.*, 2001) puis sa rapide élimination dépend de sa retranslocation *via* le canal Sec61 (Bebok *et al.*, 1998) et du protéasome cytosolique qui peut être ou non associé au RE, ou les deux (Oberdorf *et al.*, 2001).

Cependant, ces auteurs montrent que malgré l'inhibition du protéasome, la dégradation des protéines CFTR sauvage ou mutée continue. Ce ralentissement de la

dégradation de la protéine CFTR, causé par l'inhibition du protéasome, n'entraîne en aucun cas la maturation de la forme immature de CFTR sauvage ou mutée (Jensen *et al.*, 1995 ; Ward *et al.*, 1995). De plus, la déplétion en ATP de la cellule n'a pas d'effet significatif sur la dégradation de la protéine CFTR suggérant l'implication d'un système protéolytique ATP-indépendant en plus de la voie ubiquitine protéasome ATP-dépendant (Lukacs *et al.*, 1994). Tous ces éléments laissent penser qu'il existe d'autres protéases au sein du système ERAD ou une voie parallèle, impliquées dans la dégradation de la protéine CFTR.

Différents points de vue se confrontent sur cette idée. Certains auteurs pensent qu'il n'existe pas d'autres protéases et que l'inhibition incomplète de la dégradation de CFTR provient d'une inhibition partielle du protéasome. Ils ont donc utilisé des inhibiteurs ciblant d'autres voies de dégradation et arrivent à la conclusion que le système ERAD serait l'unique système de dégradation de CFTR (Gelman *et al.*, 2002). Au contraire, une étude menée par l'équipe de Dorner tend à démontrer que des cystéines protéases pourraient être impliquées dans la voie de dégradation de la protéine CFTR (Stratford *et al.*, 2003).

Il est important de noter que l'existence d'une voie de dégradation alternative du système ERAD a déjà été proposée pour d'autres protéines (Waxman *et al.*, 1987 ; Urade *et al.*, 1993 ; Heinemann et Ozols, 1998 ; Loo et Ckarke, 1998 ; Amshoff *et al.*, 1999 ; Cabral *et al.*, 2000 ; Mancini *et al.*, 2003). En effet l'équipe de Sifers a montré que la protéine incorrectement repliée humaine α 1-antitrypsine pouvait être dégradée par des voies distinctes suivant le type de mutant : le mutant nul de Hong Kong est dégradé par le protéasome (Liu *et al.*, 1999) alors que le mutant PI Z est dégradé par une protéase encore inconnue, sensible aux inhibiteurs des tyrosines-phosphatases (Cabral *et al.*, 2000). Récemment, il a été montré que la forme incorrectement repliée de la chaperonne BiP est dégradée par une voie indépendante du protéasome (Donoso *et al.*, 2005).

A l'échelle de la cellule, l'ATP a un rôle primordial. Cependant, à côté de l'ATP, il existe d'autres nucléotides comme le GTP. Ce dernier joue un rôle également très important dans de nombreux processus cellulaires tels que la croissance, la traduction, la transduction des signaux extracellulaires, le trafic vésiculaire....(Wittinghofer *et al.*, 1997 ; Millman et Andrews, 1997). Ainsi, nous avons donc pensé que le changement de la concentration intracellulaire du GTP pourrait être un facteur contribuant, directement ou indirectement, à la dégradation des protéines incorrectement repliées impliquant des GTPases.

VII/ Les protéines G ou GTPases

Par définition, les GTPases lient et hydrolysent le GTP, un co-enzyme de transfert de groupement phosphate, et existent ainsi sous trois formes : liée au GTP, liée au GDP et vide (échange entre le GDP et la GTP). L'activation de la protéine G se fait par échange du GDP par le GTP, provoquant un changement conformationnel ; alors que le passage à l'état inactif se fait par hydrolyse du GTP. Ces deux étapes sont lentes et nécessitent des protéines régulatrices (Bourne *et al.*, 1991).

Il existe deux grandes familles de protéine G : les petites protéines G monomériques comme Ras, Rho, Rac, Sar, SRP...et les protéines G hétérotrimériques composées de trois sous-unités (α , β et γ).

A. Les protéines G monomériques

La famille des petites protéines G monomériques est impliquée dans la prolifération cellulaire (voie des MAP Kinases), dans la polymérisation de l'actine et surtout dans le trafic vésiculaire (Clabecq *et al.*, 2000). Les membres de cette famille possèdent une séquence consensus (commune aussi à la sous-unité $G\alpha$) responsable de l'échange GTP-GDP et de l'activité GTPasique intrinsèque. L'échange du GDP en GTP, en présence de la GEF (Guanine Exchange Factor), a lieu au niveau du site de fixation des nucléotides. L'interaction entre le phosphate γ et les résidus amino-acyls, Lys16 et Gln 61, placés dans le domaine Ras-like jouent un rôle primordial dans la stabilisation de l'état de transition (Liang, 2003). Le passage à l'état inactif de la petite protéine G a lieu par l'hydrolyse du phosphate γ du GTP en présence d'eau et de sa GAP (GTPase Activating Protein) qui interagit avec un oxygène du phosphate en position β par l'intermédiaire de l'Arg 789 (Allin *et al.*, 2001).

B. Les protéines G hétérotrimériques

Cette famille de protéines G joue un rôle important dans la régulation de la réponse cellulaire à son environnement et est impliquée dans la transduction des signaux entre les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de la membrane plasmique et les effecteurs enzymatiques intracellulaires. La fixation du ligand ou premier messager (Hormone, Ca^{2+} ...) sur le RCPG active l'échange du GDP par le GTP au niveau de la sous-unité α ce qui a pour conséquence la dissociation des sous-unités en $\text{G}\alpha$ et $\text{G}\beta\gamma$. $\text{G}\alpha$ -GTP peut alors interagir avec divers effecteurs enzymatiques (adénylate cyclase, guanylate cyclase...) pour donner naissance aux seconds messagers (AMPc, GMPc...) qui transmettent le signal dans le cytosol par l'intermédiaire de protéines (**Figure H35**). $\text{G}\alpha$ est donc la sous-unité activatrice ou inhibitrice qui agit sur l'effecteur. L'hydrolyse du GTP par l'activité intrinsèque GTPase de $\text{G}\alpha$ et les protéines régulatrices des RCPG, appelées RGS (Regulatory of G protein Signaling), permet le retour à la forme $\text{G}\alpha$ -GDP puis la formation du trimère $\text{G}\alpha\beta\gamma$ inactif (Wang *et al.*, 2002) (**Figure H35**).

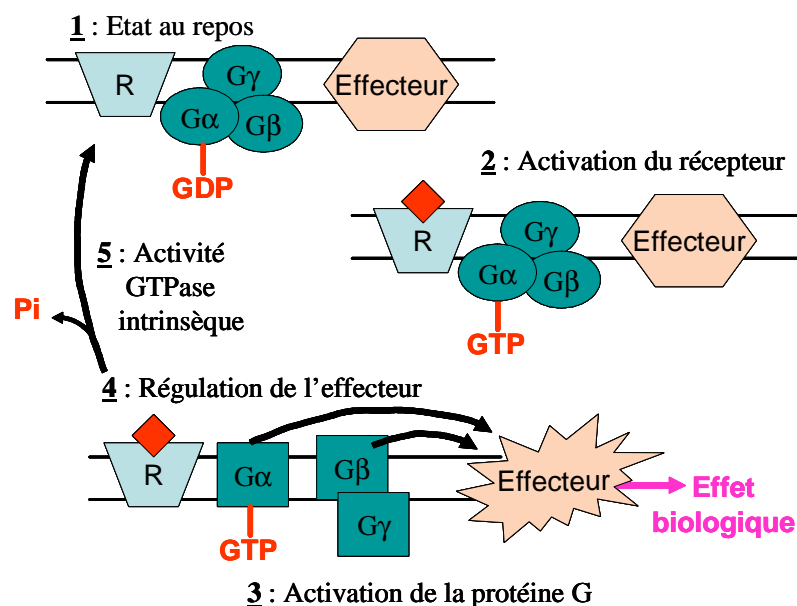


Figure H35: Transduction du signal par les protéines G hétérotrimériques.

Un récepteur au repos (1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (2). Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur, induit par cette liaison, permet l'activation de l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation de la protéine-G hétérotrimérique (sous-unités $\text{G}\alpha$ et $\text{G}\beta\gamma$) (3) qui régulent l'activité de divers effecteurs (4) membranaires ou cytosoliques. Le déclenchement de l'activité phosphatase, intrinsèque à la sous-unité $\text{G}\alpha$ entraîne la réassociation des sous-unités $\text{G}\alpha$ et $\text{G}\beta/\gamma$ (5) et le retour à l'état initial (1).

Les protéines $G\alpha$ sont réparties en plusieurs classes, en fonction des homologies de séquence et de leur capacité à activer ou inhiber certains effecteurs (**Figure H36**)

- ④ $G\alpha_s$ (stimulateur) active l'adénylate cyclase afin d'augmenter la synthèse de l'AMPc.
- ④ $G\alpha_i$ (inhibiteur) inhibe l'adénylate cyclase.
- ④ $G\alpha_o$ (olfacteur) est associé aux récepteurs olfactifs.
- ④ G_t (transducine) transduit les signaux visuels dans la rétine en conjonction avec la rhodopsine.
- ④ G_q stimule la phospholipase C.
- ④ La famille $G_{12/13}$ est importante pour réguler le cytosquelette, les jonctions cellulaires, et les autres processus liés au mouvement.

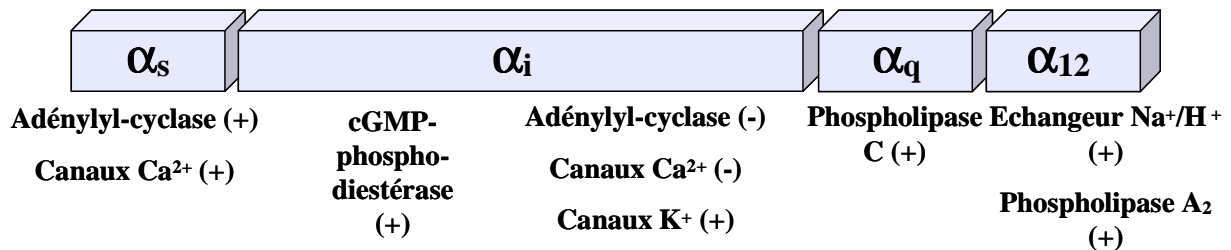


Figure H36: Les différents types de $G\alpha$ et leurs effecteurs enzymatiques respectifs

Les sous-unités β et γ sont solidement liées l'une à l'autre. Le complexe $G\beta\gamma$ est libéré de la sous-unité $G\alpha$ après un échange GDP-GTP. Le complexe $G\beta\gamma$ libre peut agir comme une molécule signal elle-même, en activant d'autres messagers secondaires ou en commandant directement des canaux ioniques. Par exemple, le complexe $G\beta\gamma$, quand il est lié à un récepteur histaminique, active la phospholipase A_2 . Les complexes $G\beta\gamma$ liés à des récepteurs muscariniques-acétylcholine, d'un autre côté, ouvrent directement les canaux GIRK (canaux à courant potassique rectifiant activé par les protéines G).

L'implication des protéines GTP-dépendantes dans les divers processus cellulaires a été étudiée soit directement par modulation de l'expression des protéines candidates, soit indirectement, par modulation de l'activité de ces protéines par l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité GTPasique comme les complexes fluoroaluminates qui sont, en fait des complexes ternaires formés de fluor, d'aluminium et d'ion hydroxyle notés AlF_x . Ces molécules inorganiques miment la structure chimique du phosphate et affectent l'activité de nombreuses enzymes GTPases et ATPases (Liang, 2003). La transducine (G_t) est une des premières

protéines G qui a servi de modèle pour l'étude de l'effet des complexes fluoroaluminates. L'ajout simultané de fluor et d'aluminium promeut la dissociation de la $G\alpha$ de la $G\beta\gamma$, inhibant ainsi son activité GTPasique (Kanaho *et al.*, 1985). Par la suite il a été montré que AlF_x se fixe de manière covalente, sur le groupement phosphate β des nucléotides-diphosphates avec une forte affinité conférant à la protéine un état semblable à celui lié au GTP. Parmi les complexes fluoroaluminates, l' AlF_3 et l' AlF_4^- sont les deux complexes majoritaires.

La fixation du GTP se fait au niveau du domaine Ras-like de la sous-unité $G\alpha$ par l'interaction entre deux résidus amino-acyls : Gln 204 et Arg 178 et le phosphate γ du GTP. Dans ce modèle, AlF_4^- mime le phosphate γ en interagissant avec les deux résidus. Il stabilise ainsi l'état de transition du phosphate et inhibe l'activité GTPasique de la sous-unité $G\alpha$ (Liang, 2003).

Mittal *et al.* sont les premiers à détecter, qu'en présence de quantité stœchiométrique de Ras-GDP et de GAP, le complexe ternaire Ras-GDP- AlF_x -GAP peut être isolé sur gel filtration (Mittal *et al.*, 1996). Mais, contrairement aux protéines G hétérotrimériques, l'activation a lieu par la fixation de l' AlF_3 qui prend une structure bipyramidale trigonale qui lui permet de mimer le phosphate γ du GTP (Liang, 2003).

En effet, diverses études ont confirmées que AlF_4^- interagit seulement avec la sous-unité $G\alpha$ des protéines G hétérotrimériques (Kahn, 1991), alors que l' AlF_3 interagit stablement avec les protéines G monomériques en présence de leur GAP (Ahmadian *et al.*, 1997 ; Bourne *et al.*, 1991).

Objectifs

I/ Contexte scientifique

Dans la maladie de la mucoviscidose, la mutation F508del représente 70% des mutations identifiées à ce jour sur le gène de la protéine CFTR. Cette mutation bloque la protéine CFTR dans le RE où elle est synthétisée. La maturation artificielle de la protéine CFTR-F508del permet de rétablir une protéine fonctionnelle présentant cependant un temps de fermeture trois fois plus long que le canal CFTR sauvage (Dalemans *et al.*, 1991). Pour rétablir le transport des ions chlorure à travers la membrane plasmique des cellules mucoviscidosiques, c'est à dire permettre à la protéine CFTR-F508del de quitter le RE et d'aller s'insérer dans la membrane plasmique, différentes stratégies ont été proposées. Parmi lesquelles la thérapie génique et la pharmacothérapie. Cette dernière s'est imposée comme une alternative à la thérapie génique, en absence de perspective à court terme, liée surtout à la nature du vecteur capable de transporter et de délivrer le gène *CFTR* sauvage.

Cependant, pour que la pharmacothérapie soit efficace et surtout spécifique, il faut connaître la biochimie et le comportement cellulaire des protéines CFTR sauvage et mutée. Ainsi, une meilleure connaissance de ces mécanismes nous permettra de prévenir la dégradation de CFTR-F508del et donc d'augmenter les chances de réussir à débloquent la protéine du RE.

II/ Objectifs

Pour dégrader les protéines transmembranaires, le système ERAD fait appel au protéasome 26S. Cependant ce processus constitue un challenge pour la cellule dans la mesure où le système protéolytique et ces substrats ne sont pas localisés dans le même compartiment cellulaire. Ceci implique que les protéines transmembranaires destinées à la dégradation sont soit transloquées à travers le canal Sec 61 vers le cytoplasme, scénario retenu pour la protéine CFTR-F508del, soit extraites directement de leur environnement lipidique et dégradées de suite par le protéasome, qui dans ce cas précis doit être associé au RE, soit les deux hypothèses réunies.

Dans l'ensemble des cas, la dégradation par le protéasome ne permet pas à elle seule d'expliquer l'élimination rapide de CFTR-F508del. En effet plusieurs observations sont en faveur de l'implication d'autres systèmes protéolytiques dont la nature reste encore inconnue :

- ☞ Premièrement, l'effet de l'inhibition du protéasome par la lactacystine, inhibiteur spécifique et irréversible du 26S, sur la dégradation de CFTR-F508del est limité dans le temps.
- ☞ Deuxièmement, la déplétion en ATP, nucléotide important pour l'assemblage et l'activité protéolytique du protéasome, n'a pas d'effet significatif sur la dégradation de CFTR-F508del.
- ☞ Troisièmement, l'inhibition, même partielle, de la dégradation de CFTR-F508del par les inhibiteurs du protéasome n'induit en aucun cas la maturation (passage du RE vers le Golgi) de CFTR-F508del.

Par ailleurs, de nombreuses études ont aussi suggéré l'implication de voies protéolytiques autre que la voie classique ubiquitine/protéasome.

Ainsi, les travaux réalisés au cours de mon doctorat ont eu pour but d'identifier le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans la dégradation rapide de la protéine CFTR-F508del au niveau du RE.

Dans ce manuscrit, je m'attacherai à expliciter les résultats obtenus sur le rôle du protéasome, de l'ATP et du GTP dans la dégradation de la protéine CFTR-F508del au niveau du RE. Bien que de nombreux progrès aient été réalisés dans la compréhension des mécanismes de contrôle de qualité des protéines membranaires nouvellement synthétisées et de dégradation des protéines incorrectement repliées, nos résultats ont mis en évidence pour la première fois le rôle du GTP et des protéines G hétérotrimériques dans la dégradation de protéines membranaires incorrectement repliées.

Matériels & Méthodes

I/ Culture cellulaire

A. Lignées cellulaires

Au cours de ce travail, nous avons utilisé deux lignées cellulaires, BHK-21 et COS-1

1- Cellules BHK-21

La lignée BHK-21 (Baby Hamster Kidney) dérive de la lignée source BHK C-13 obtenue à partir de reins de hamster doré ou syrien (*Mesocricetus auratus*). Ce sont des cellules rénales fibroblastiques adhérentes développées pour la première fois par Macpherson et Stoker (Stoker et Macpherson, 1964). La lignée BHK-21 est couramment utilisée pour la caractérisation biochimique de protéines recombinantes qui y sont exprimées, soit de façon transitoire, soit de façon stable. Ces cellules sont aussi utilisées pour la production de vaccins ou l'étude du métabolisme cellulaire.

2- Cellules COS-1

La lignée COS-1 (African green monkey kidney), d'origine rénale, est obtenue après transformation par l'antigène T de SV40 (Simian Vacuolating Agent 40) muté au niveau de son origine de réplication (SV40 ori-defective) pour éviter la réplication virale. Ces cellules sont surtout utilisées en imagerie, car elles permettent une excellente visualisation des différents compartiments intracellulaires. Elles sont aussi connues pour leur production accrue de protéines recombinantes par transfection transitoire.

B. Conditions de culture

Les cellules BHK-21 et COS-1 sont maintenues en culture dans une boîte de 10 cm contenant le milieu DMEM/F-12 pH 7,5 (Dubelco's Modified Eagle Medium/HamF-12) (*Invitrogen*, France) additionné de 5% de sérum de veau foetal (SVF, *Invitrogen*, France) et incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

C. Repiquage

Les cellules sont repiquées tous les deux jours, à confluence. Pour ce faire, les cellules en culture sont lavées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, *Invitrogen*, France) sans calcium (Ca²⁺) ni magnésium (Mg²⁺), puis décollées par ajout de trypsine (*Invitrogen*, France) à 0,05% pendant 1min à température ambiante (TA). La trypsine est inhibée par l'addition de

Ca²⁺, présent dans le milieu de culture. Les cellules sont alors resuspendues puis partagées dans des boîtes de 10 cm.

D. Congélation

A la suite du décrochage des cellules à la trypsine, le culot cellulaire, obtenu après centrifugation à 2000xg à TA, est resuspendu dans le milieu de congélation suivant :

- 10% DMSO (Diméthylsulfoxyde) (*Sigma*, France)
- 20% SVF
- 70% milieu DMEM/F-12

Les cellules sont par la suite placées successivement pendant 4h à -20°C, puis transférées à -80°C pendant ~ 4 mois et finalement stockées indéfiniment dans de l'azote liquide (-180°C). La décongélation peut se faire à n'importe quel moment du processus.

II/ Expression des protéines recombinantes

A. Protéines exprimées

1- CFTR sauvage et F508del

Les cellules BHK-21 ont été utilisées pour exprimer de façon stable les protéines CFTR sauvage et mutée (F508del). Ces lignées cellulaires ont été générées dans le laboratoire du Dr GL Lukacs (Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) et généreusement fournies à notre laboratoire. Les cellules BHK-21 constituent un très bon modèle pour étudier biochimiquement et métaboliquement le comportement cellulaire de CFTR, d'autant plus que ces cellules n'expriment pas la protéine CFTR de manière endogène et produisent une CFTR correctement repliée et parfaitement fonctionnelle. L'expression de CFTR (sauvage et mutée F508del) a été réalisée grâce à l'introduction, dans les cellules BHK-21, du plasmide pNut (Haardt *et al.* 1999). Ce plasmide contient un gène muté codant pour l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) impliquée dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Cette mutation empêche l'inhibition de l'activité de DHFR par le méthotrexate. Ce dernier est capable d'inhiber spécifiquement, à 500µM, l'enzyme DHFR sauvage exprimée de manière endogène dans les cellules BHK-21 et d'entraîner l'apoptose de la cellule au bout de 24h de traitement. L'introduction conjointe de CFTR et de la DHFR mutée au sein du plasmide pNut

nous permet de sélectionner les cellules résistante au méthotrexate, autrement dit, contenant le gène d'intérêt. Pour faciliter la détection en augmentant la spécificité de l'interaction entre la protéine et l'anticorps, les deux protéines ont été marquées par l'étiquette HA (hémagglutinine du virus *Influenza*). Le HA (11 acides aminés : YPYDVDPDYANS) a été placé au niveau de la partie C-terminale, entre les acides aminés 1476 et 1477. Toutes les vérifications ont été réalisées pour s'assurer que le HA ne perturbe pas la biosynthèse, la maturation, la stabilité et la fonction de la protéine CFTR (Haardt *et al.* 1999).

2- VSVG-GFP

Les cellules BHK ont aussi été utilisées pour exprimer de façon stable la protéine chimère VSVG-GFP (Vesicular Stomatitis Virus G-Green Fluorescent Protein). Cette construction, réalisée au sein de l'équipe du Dr J Lippincott-Schwartz (Cell Biology and Metabolism Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institute of Health, Bethesda, USA), nous a généreusement été cédée par le Dr GL Lukacs. La VSVG est une protéine dont l'adressage intracellulaire dépend de la température. A 40°C, cette protéine est confinée dans le RE (Presley *et al.*, 1997). Après passage à 32°C, elle est exportée vers la membrane plasmique *via* l'appareil de Golgi. L'ADN complémentaire (ADNc) codant pour cette protéine chimère a été introduit dans le vecteur pNut.

3- TCR alpha (TCR α)

La sous-unité α du récepteur T (TCR α), étiquetée au niveau de sa partie C-terminale avec l'étiquette HA, a été généreusement cédée par le Dr RR Kopito (Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, California). Cette construction a été exprimée de façon stable dans les cellules BHK-21 en utilisant le plasmide pcDNA3.1 (*Invitrogen*, France) contenant un gène de résistance à la néomycine (G418), un antibiotique appartenant à la famille des aminoglycosides. Ce dernier, utilisé à 1mg/mL, permet de sélectionner les cellules transfectées et d'éliminer les cellules non transfectées ou celles qui ont perdu l'expression au cours de la sélection.

4- DsRed-RE

Nous avons généré des cellules BHK-CFTR-F508del exprimant de manière stable la protéine DsRed-RE par transfection du plasmide pDsRed-RE (*Clontech*, France). DsRed-RE est une protéine de fusion fluorescente contenant la séquence de localisation de la calreticuline, la protéine fluorescente de *Discosoma sp.* (DsRed) et la séquence de rétention

dans le RE (KDEL). Ces cellules nous ont permis d'isoler les fractions enrichies en RE par mesure de la fluorescence.

B. Transfection transitoire

Toutes les transfections transitoires ont été réalisées dans les cellules COS-1.

La transfection transitoire est réalisée à l'aide du kit FuGENE (*Roche*, France). Pour ce faire, 6µL de FuGENE mélangé avec 90µL de milieu de culture sans sérum sont incubés 5min à TA, puis 2µg d'ADNc codant pour la protéine d'intérêt sont ajoutés. L'ensemble est incubé au moins 15min à TA avant d'être rajouté sur les cellules en culture. Après 24h, les cellules sont partagées en deux lots pour être utilisées, au bout de 48h, dans les expériences d'immunomarquage et d'immunodétection (Western Blot). Aucune toxicité cellulaire n'a été observée au bout de 24h de présence de FuGENE.

C. Transfection stable au phosphate de calcium et sélection des clones positifs

Toutes les transfections stables ont été réalisées dans les cellules BHK-21.

15µg du plasmide comportant l'ADNc de la protéine d'intérêt sont mélangés avec:

- 450µL d'eau stérile.
- 50µL de CaCl₂ 2,5M
- 500µL de BES (*Sigma*, France) concentré deux fois

Pour permettre la complexation du plasmide avec le Ca²⁺ et le BES, le mélange est incubé au moins 15min à TA avant d'être rajouté aux cellules en culture. Ce procédé est très toxique pour les cellules. Pour minimiser cet effet, nous remplaçons le milieu de transfection par le milieu de culture normal au bout de 6h.

Après deux semaines de sélection, les cellules résistantes au méthotrexate ou au G418 forment des clones. Ces amas de cellules, une fois identifiés, sont lavés avec du PBS déplété en Ca²⁺ et en Mg²⁺, décrochés à l'aide de la trypsine et placés dans une plaque de 24 puits en présence de 1mL de milieu de culture normal contenant du méthotrexate ou du G418 à des concentrations de 500µM et 0,4mg/mL respectivement.

Les plaques sont par la suite mises en culture à 37°C sous 5% de CO₂. A 100% de confluence les clones sont transférés dans des plaques de 6 puits, puis dans les boîtes de 10

cm. Les clones positifs sont identifiés par deux techniques : immunodétection et immunofluorescence.

III/ La cytométrie en flux

A. Principe de l'analyse cytométrique

La cytométrie en flux permet d'analyser et de trier des cellules mises en suspension dans un liquide et marquées à l'aide d'un fluorochrome. Les cellules passent une à une devant un rayon laser qui excite la molécule fluorescente. La spécificité de l'excitation lumineuse est déterminée par la longueur d'onde du rayon laser, choisie parmi les raies disponibles.

Un tri, séparation physique des cellules, peut être réalisé. La récupération est effectuée sur lames ou en tubes selon les besoins. Le tri n'altère pas la viabilité des cellules et peut être effectué stérilement. Il permet de séparer très spécifiquement une fraction de la population. En ce qui me concerne, cette méthode est utilisée pour isoler les cellules stablement transfectées par une protéine fusionnée à une protéine fluorescente (exemple : le DsRED).

B. Protocole de l'analyse cytométrique

Les cellules à analyser sont trypsinées et récoltées dans un tube de 15mL. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 1mL de PBS-EDTA puis filtré directement dans un tube à hémolyse avec filtre. Ces étapes doivent se faire stérilement s'il s'agit d'effectuer un tri de cellules transfectées, que nous souhaitons par la suite maintenir en culture.

Le principe de fonctionnement d'un cytomètre de flux est illustré sur la **Figure M1**.

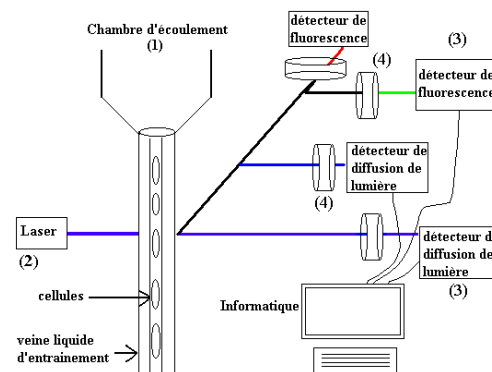


Figure M1: Principe d'un cytomètre en flux.

(1): Chambre d'écoulement, (2): Source d'excitation lumineuse/laser, (3): Détecteurs, (4): Filtres optiques

IV/ Détermination des proportions de cellules vivantes, nécrosées ou apoptotiques

A. Proportion de cellules vivantes

Pour évaluer l'effet des différents traitements sur la viabilité cellulaire, une coloration des cellules au bleu trypan (*Sigma*, France) est réalisée après vérification de la morphologie cellulaire au microscope photonique à fond clair (*Olympus* CK-40, objectif x25). Les cellules mortes sont visualisées en bleu car leur membrane plasmique est perméable au bleu trypan, alors que les cellules vivantes sont transparentes.

Les cellules sont tout d'abord détachées par la trypsine, resuspendues dans du PBS froid contenant 0,1mM de Ca^{2+} et 2mM de Mg^{2+} et placées à 4°C. Le comptage cellulaire est réalisé grâce à la cellule de Malassez après ajout du bleu trypan à la dilution 1/2. Le pourcentage des cellules vivantes (P_{CV}) par rapport aux cellules mortes est déterminé d'après la relation suivante :

$$P_{CV} = (\text{Nombre de cellules vivantes}/\text{Nombre de cellules totales}) * 100$$

B. Proportion de cellules en apoptose

Le niveau d'apoptose a été évalué par coloration des cellules au Hoeschst (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) qui est une molécule fluorescente (longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) : 360nm et longueur d'onde d'émission (λ_{em}) : 470nm, ce qui correspond aux spectres du DAPI, 4',6-Diamidino-2-Phenylindole). Le Hoeschst est un colorant spécifique de l'ADN, et permet de visualiser la fragmentation du noyau.

C. Proportion de cellules en nécrose

Pour déterminer le degré de nécrose des cellules, nous avons utilisé l'iodure de propidium (IP), à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'IP (λ_{ex} = 543nm et λ_{em} = 650nm ce qui correspond aux spectres du TRITC, Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate), qui est une molécule intercalante de l'ADN, pénètre uniquement dans les cellules dont la membrane plasmique est perforée, signe caractéristique du phénomène de nécrose.

D. Caractérisation des cellules par microscopie

Pour observer et comptabiliser les cellules apoptotiques ou nécrosées, nous avons, après chaque traitement, fixé un échantillon de cellules à la lamelle avec du paraformaldéhyde 4% (*Sigma*, France) pendant 20min à TA. Ces cellules ont été préalablement incubées avec le Hoeschst ou l'IP 5min avant la fin du traitement. Après montage entre lame et lamelle, l'observation de la fluorescence est réalisée au microscope à fluorescence (Axiovert 200M, *Zeiss*, France). Ce microscope est équipé d'un jeu de filtres permettant la détection du Hoescht et de l'IP, et d'une caméra (AxioCam MRm, *Zeiss*) permettant l'acquisition d'image avec l'objectif à immersion 63x. Les cellules sont ensuite comptées et triées suivant leurs caractéristiques (coloration par l'IP pour les cellules nécrosées, noyau fragmenté après coloration au Hoescht pour les cellules en apoptose). Ce comptage est réalisé 6 fois sur un échantillon de 100 cellules pour chaque traitement.

V/ Déplétions en ATP et en GTP

A. Déplétion en ATP

L'adénosine triphosphate (ATP), molécule hautement énergétique, est produite à l'échelle de la cellule au niveau du cycle de Krebs (CK) et dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Pour réduire la concentration intracellulaire de l'ATP, nous avons utilisé un milieu de déplétion en ATP qui ne contient ni pyruvate, ni glucose (pour inhiber le CK), ni ATP. Ce milieu est additionné de 5mM de 2-désoxy-D-glucose (inhibiteur du CK) et de 0,4µg/mL d'antimycine A (inhibiteur de l'ATP synthase de la chaîne respiratoire mitochondriale). En effet l'antimycine A, antibiotique bactérien, inhibe le transfert des électrons du complexe III du cytochrome b vers le cytochrome c, et empêche ainsi la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase.

B. Déplétion en GTP

La déplétion en GTP est obtenue en incubant les cellules dans un milieu de culture normal, en présence de 50µM d'acide mycophénolique (MPA) (*Sigma*, France). Le mécanisme d'action de cette molécule immunodépressive est bien connu (Escobar-Henriques *et al.*, 2001). En effet, le MPA est un inhibiteur de l'Inosine MonoPhosphate déshydrogénase (IMPDH), enzyme impliquée dans la synthèse *de novo* des dérivés guanosylés (**Figure M2**).

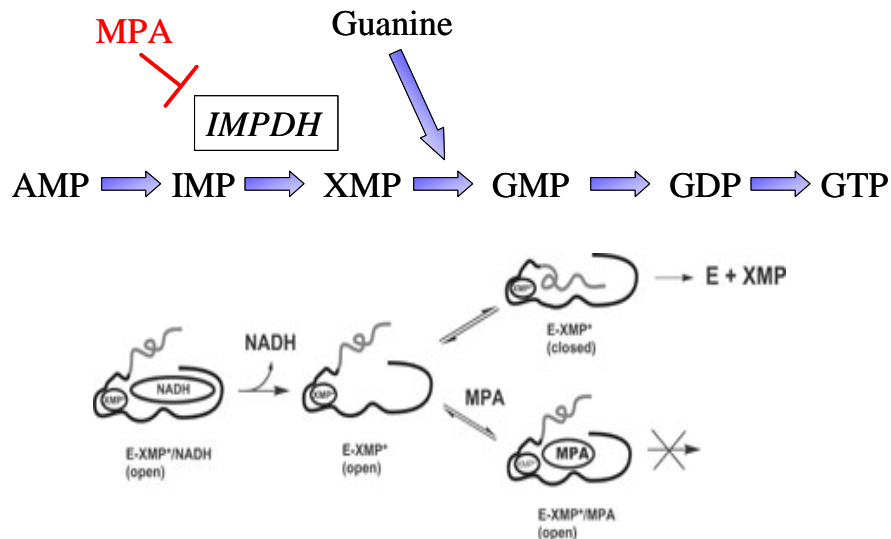


Figure M2: Mode d'action du MPA.

Le MPA permet la déplétion spécifique en GTP *via* l'inhibition de l'IMPDH, enzyme clé de la synthèse du GDP. Le MPA se fixe à l'enzyme empêchant ainsi la conversion de l'Inosine MonoPhosphate (IMP) en Xanthine MonoPhosphate (XMP).

VI/ Détermination de la concentration intracellulaire en ATP ($[ATP]_i$) et en GTP ($[GTP]_i$)

A. Mesure de la $[ATP]_i$

1- Principe

Le dosage s'effectue à l'aide du kit Bioluminescent Somatic Cell Assay[®] (FL-ASC, Sigma, France), basé sur la lumière émise suite à l'oxydation de l'adényl-luciférine, obtenue par la réaction catalysée par la luciférase entre l'ATP libre et la luciférine. La cinétique de la réaction enzymatique est composée de trois phases principales : un temps de latence, une phase de croissance et une phase de décroissance de l'intensité lumineuse.

L'intensité lumineuse maximale (I_{max}) varie proportionnellement à la quantité d'ATP présent dans le milieu. Le dosage de l'ATP repose donc sur la mesure de l'intensité de l'émission lumineuse qui se produit en présence de luciférine et de luciférase (**Figure M3**).

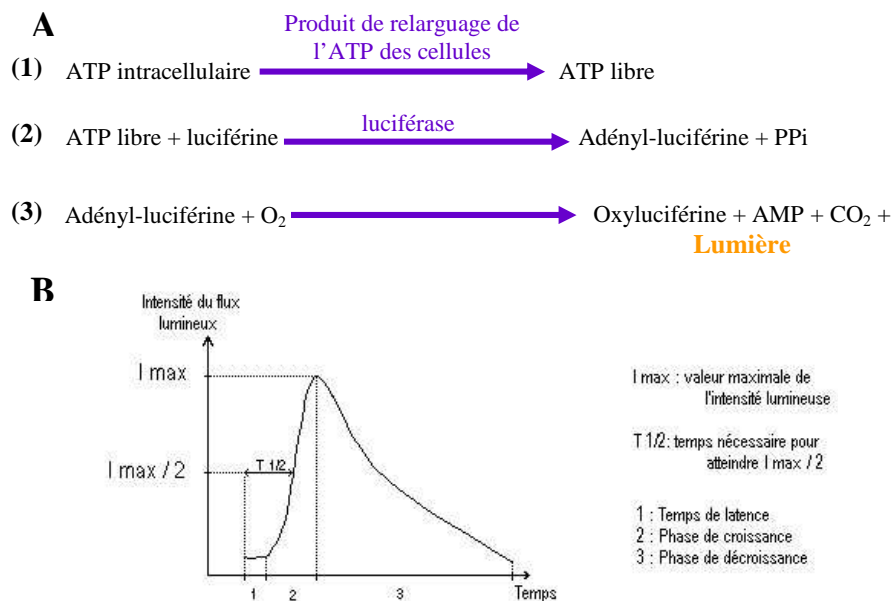


Figure M3: Réaction enzymatique de bioluminescence permettant le dosage de l'ATP

A: Schéma réactionnel

B: Représentation de la cinétique de réaction luciférine-luciférase composée de trois phases principales : un temps de latence (1), une phase de croissance (2) et une phase de décroissance de l'intensité lumineuse (3).

2- Protocole

Les cellules cultivées dans les plaques 6 puits sont lavées avec du PBS déplété en Ca²⁺ et en Mg²⁺, puis détachées avec de la trypsine. Cette dernière est inhibée par l'ajout de tampon TB (10mM Hepes pH 7,8, 50mM NaCl, 0,1mM CaCl₂ et 1mM MgCl₂). Les cellules, culottées par centrifugation à 4°C, sont resuspendues dans 500μL de tampon TB.

50μL de la suspension cellulaire traitée par un agent de relargage de l'ATP (Somatic Cell ATP Releasing Reagent) est analysée en absence (L_(SAM)) ou en présence d'un standard interne (L_(SAM+IS)). L'ATP Assay Mix contenant le complexe luciférine-luciférase est dilué 25 fois puis est ajouté au mélange cellulaire. L'ATP relargué dans le milieu réagit avec le complexe luciférine-luciférase et permet la formation d'adényl-luciférine. Le produit d'oxydation est mesuré à l'aide du luminomètre (modèle Sirius, Berthold, France).

La quantité d'ATP dans l'échantillon (ATP_(SAM)) est déterminée à l'aide de la formule

$$\text{ATP}_{(\text{SAM})} = (\text{ATP}_{(\text{IS})} \times \text{L}_{(\text{SAM})}) / (\text{L}_{(\text{SAM} + \text{IS})} - \text{L}_{(\text{SAM})}) \text{ où :}$$

- ATP_(IS) correspond à la quantité d'ATP ajouté comme standard interne
- L_(SAM) correspond à la lumière émise par l'ATP relargué dans le milieu par les cellules

- $L_{(SAM+IS)}$ correspond à la lumière émise par l'ATP relargué dans le milieu par les cellules en présence du standard interne

En parallèle le nombre de cellules contenu dans les 50 μ L de la suspension cellulaire est déterminé à l'aide de la cellule de Mallassez afin de ramener le taux en ATP par million de cellules.

La concentration en ATP a aussi été mesurée par la technique d'HPLC décrite dans le paragraphe ci-dessous.

B. Mesure de la $[GTP]_i$ par chromatographie

1- Principe

Parmi les différents types de chromatographies existantes, l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est une des méthodes analytiques les plus utilisées. Cette méthode est basée sur la séparation des composants d'un liquide (phase mobile) au travers d'une colonne (support solide = phase stationnaire). Il existe quatre types d'HPLC différents : phase inverse, adsorption, échangeuse d'ions et exclusion. Les principaux détecteurs utilisés sont les détecteurs réfractométriques, U.V. (classique ou à barrette de diodes), à conductivité thermique et électrochimique.

2- Préparation des échantillons

A la fin de chaque traitement, les cellules sont placées sur la glace et lavées trois fois avec du PBS froid. L'extraction de l'ensemble des nucléotides est réalisée avec 300 μ L d'acétonitrile et 700 μ L d'eau stérile froide pendant 10min à 4°C. Les cellules sont ensuite culottées par centrifugation (13200 \times g, 20min à 0°C). A partir du surnageant, nous effectuons un dégazage à l'azote de l'acétonitrile pendant 30min sur la glace pour un mélange de nucléotides qui sera par la suite analysé par HPLC. Les protéines du culot sont extraites avec 50 μ L de NaOH 1M pendant 10min. Les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation (13500 \times g, 15min à 0°C).

3- Protocole

L'appareil utilisé lors de nos analyses est une HPLC 1100, HP chemstation (*Hewlett Packard*, Wilmington, DE) équipée d'un détecteur à barrette de diodes. La colonne employée est une phase inverse Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 x 75 mm, 3,5 μ m, *Agilent*, USA) à 1mL/min. Le tampon utilisé contient 93% d'une solution contenant 50mM de phosphate de

sodium et 10mM de Tetrabutyl Ammonium Sulfate de 10mM (pH 7), et 7% d'acétonitrile. Le gradient utilisé pour séparer les différents nucléotides est présenté dans le **tableau MI** ci dessous.

Tableau MI: Programme du gradient nécessaire à la séparation des nucléotides.

Etape	Temps de l'étape (min)	Tampon (%)	Acétonitrile (%)	Débit (mL/min)
1	20	100	0	1
2	15	0	100	1
3	10	100	0	1

De manière à quantifier les différents nucléotides séparés, un mélange de standards nucléotidiques contenant ATP, ADP, GTP et GDP à 10mM (2,5µL de chaque nucléotide complété à 50µL avec de l'eau distillée stérile) est injectée. Cette injection de standards externes est effectuée lors de chaque analyse. A partir des chromatogrammes obtenus, l'aire des pics des différents nucléotides est intégrée puis transformée en concentration (µM) grâce au standard du jour, puis le résultat final est exprimé en µmol/mg de protéines grâce au dosage protéique (paragraphe **XI**).

C. Test de l'activité GTPasique

Ce test permet de détecter la présence de protéines à activité GTPasique dans les protéines isolées à partir des microsomes. L'essai est réalisé comme indiqué dans le **tableau MII**

L'activité GTPasique est basée sur la réduction du NADH en NAD⁺, suivie à 340nm par spectrophotométrie, en présence de lactate déshydrogénase (LDH). Le système couplé permet la régénération du GDP, produit par l'activité GTPasique de la protéine, en GTP par la réduction du NADH en NAD⁺.

Pour chaque essai, 5min avant la cinétique, le système couplé est incubé avec le tampon de dégradation (125mM potassium acétate, 2,5mM magnésium acétate, 10mM glucose, 1mM DTT, 25mM Hepes pH 7,2) dans la cuve à TA. Juste avant le début de la cinétique, le GTP est ajouté 30s avant l'apport de la protéine. La mesure de la DO se fait à 340nm pendant 10min. 2 blancs sont effectués : un en absence de protéine et en présence de GTP et un en présence de la protéine et en absence de GTP.

Tableau MII: Composition du tampon de mesure de l'activité GTPasique.

	Réactifs	Concentrations finales	Volumes (μL)
Système couplé	KCl (1M)	30mM	45
	Phospho-énol Pyruvate (200mM pH 6,6)	4mM	30
	NADH (400mM)	0,4mM	1.5
	Pyruvate Kinase (10mg/mL)	40 $\mu\text{g/mL}$	6
	Lactate Déshydrogénase (LDH) (10mg/mL)	20 $\mu\text{g/mL}$	3
	MgCl ₂ (1M)	1mM	1.5
	Protéine	100 μg	-
	GTP (100mM pH 7)	5mM	75
	Tampon de dégradation		1000

La pente obtenue lors de ces cinétiques permet de calculer l'activité GTPasique contenue dans chaque échantillon. Pour chacun, après correction de la ligne de base, il est nécessaire de calculer :

- la pente à l'origine ΔA (min^{-1}) : $\Delta\text{Abs}/\Delta\text{temps}$
- l'activité de l'enzyme dans l'échantillon (loi de Beer-Lambert) : $\Delta A = \epsilon \cdot l \cdot \Delta C$

d'où $\Delta C = \Delta A / \epsilon \cdot l$ avec $\epsilon = 6220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, à 340nm

ΔC est une activité ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) qui exprime la variation de produit formé par minute

- le nombre de moles de produit formé par minute Δn ($\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) = $\Delta C \times V$ ($V = 0,001\text{L}$),
- la masse de protéines utilisées pour chaque dosage : $m_P = [\text{Protéine}]$ (mg/mL) $\times V_f$ ($V_f = 1 \text{ mL}$)
- l'activité GTPasique dans l'échantillon ($\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) : $AS = \Delta n / m_P$.

VII/ Test de fixation de CFTR sur colonne d'ATP et de GTP

La liaison de l'ATP et du GTP au niveau des NBDs de CFTR est étudiée grâce à l'utilisation d'ATP fixé à une colonne sépharose-ATP. Une extraction de protéines totales est effectuée à partir d'une boîte 10 cm de cellules à confluence. Les cellules sont lavées trois fois avec le tampon de lyse hypotonique (7,5mM Tris HCl pH 7,4). Puis, les cellules sont incubées pendant 5min avec ce même tampon additionné de 200 μM d'orthovanadate de sodium et 0,1mM d'EGTA. Une fois décollées, les cellules sont centrifugées à 13200 $\times g$ pendant 5min. Le culot est resuspendu dans 900 μL de tampon d'extraction (0,2% Triton X-100, 150mM

NaCl, 20mM Tris HCl pH 7,4) additionné avec les inhibiteurs de protéases. Les extraits ainsi obtenus sont ajoutés à des colonnes sépharose-ATP et -GTP lavées avec le tampon d'extraction, en présence de 3mM de MgCl₂ et de 200μM d'orthovanadate de sodium. Le mélange est incubé 1h à 4°C. Les protéines non liées sont éliminées par trois lavages avec 1mL de tampon d'extraction. Afin de déterminer si l'AlF₄⁻ entre en compétition avec l'ATP pour la liaison avec les NBDs de CFTR, une élution avec 10μM d'AlF₄⁻ dilué dans le tampon d'élution (40mM NaCl, 10mM Tris HCl, pH 7,4) est effectuée. Puis, une deuxième élution avec 5mM d'ATP, pour montrer la liaison avec l'ATP, est réalisée. Enfin une dernière élution est faite avec du LSB 2X (Laemmli Sample Buffer, 6% SDS, 62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 20% Glycérol, 0,04% bleu de bromophénol) additionné de 10% β-mercaptoéthanol pendant 10min à 37°C. La même manipulation est effectuée avec la colonne sépharose-GTP en remplaçant l'ATP par du GTP au moment de la deuxième élution. La présence de CFTR est déterminée par immunodétection.

VIII/ Perméabilisation et caractérisation cellulaires

La perméabilisation consiste à dialyser le cytoplasme cellulaire contre un tampon dont le pH est proche du pH intracellulaire, mais dont la composition diffère totalement. Seules leurs concentrations et leurs forces osmotiques sont très voisines.

A. Procédure de perméabilisation cellulaire

Les cellules BHK-21 sont perméabilisées dans le tampon CSK (cytoskeletal) pH 6,8 (0,3M sucrose, 0,1M KCl, 2,5mM MgCl₂, 1mM sodium EDTA free, 10mM PIPES) contenant 50μg/mL de digitonine (*Sigma*, France). Brièvement, les cellules sont d'abord lavées deux fois avec le tampon CSK à TA, puis incubées pendant 10min avec le tampon CSK contenant de la digitonine. Le CSK contenant le cytoplasme est récupéré et conservé pour les mesures d'activités du protéasome, de la [ATP]_i et de la lactate déshydrogénase (LDH), marqueur spécifique du compartiment cytoplasmique. Les cellules sont ensuite rincées avec le tampon CSK et incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant le temps de traitement.

B. Caractérisation de la perméabilisation

Pour vérifier l'efficacité de la perméabilisation, nous avons mesuré l'activité de la LDH. La détermination de son activité se fait par la mesure de la décroissance de la

fluorescence du NADH à 340nm. En effet, le NADH, coenzyme de la réaction de transformation du pyruvate en lactate (Aragon *et al.*, 1980), est utilisé comme indicateur de l'activité de la LDH pour le calcul de son activité spécifique (Figure M4).

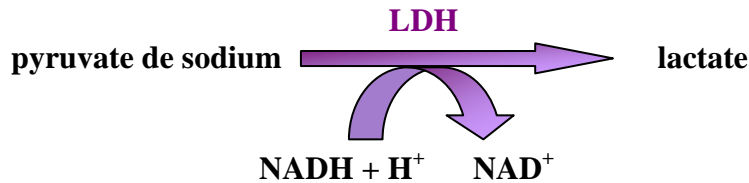


Figure M4: Réduction du pyruvate de sodium en lactate par la lactate déshydrogénase.

Il est d'abord nécessaire de réaliser un blanc sur 1mL d'une solution à 0,3mM NADH. Afin de vérifier que nos solutions ne contiennent pas d'éléments contaminant, une cinétique sur 6min est réalisée après avoir ajouté 33 μ L du pyruvate de sodium (100mM). Chaque échantillon est incubé avec 1mL de tampon NADH pendant 5min à TA. Puis les cinétiques sont réalisées, sous agitation, immédiatement après ajout du pyruvate de sodium. La pente obtenue lors de ces cinétiques permet de calculer l'activité spécifique de la LDH contenue dans chaque échantillon. Cette activité correspond à la quantité de NADH utilisé par la LDH. Pour chaque échantillon, après correction de la ligne de base, il est nécessaire de calculer :

- la pente à l'origine ΔA (min^{-1}) : $\Delta \text{Abs} / \Delta \text{temps}$
- l'activité de l'enzyme dans l'échantillon (loi de Beer-Lambert) : $\Delta A = \epsilon \cdot l \cdot \Delta C$

$$\text{d'où } \Delta C = \Delta A / \epsilon \cdot l \text{ avec } \epsilon = 6220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}, \text{ à } 340\text{nm}$$

ΔC est une activité ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) qui exprime la variation de produit formé par minute

- le nombre de moles de produit formé par minute Δn ($\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) = $\Delta C \times V$ ($V = 0,001\text{L}$)
- la masse de protéines utilisées pour chaque dosage : $m_p = [\text{Protéine}]$ (mg/mL) $\times V_f$ ($V_f = 1 \text{ mL}$)
- l'activité spécifique de la lactate déshydrogénase dans l'échantillon ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) :

$$\text{AS} = \Delta n / m_p.$$

IX/ Détermination de la demi-vie de la protéine CFTR

Afin de calculer la demi-vie de la protéine CFTR-F508del, nous utilisons la cycloheximide (CHX, 4-[(2R)-2-[(1S,3S,5S)-3,5-diméthyl-2-oxocyclohexyl]-2hydroxyéthyl]-2,6-piperidinedione), un inhibiteur de la synthèse protéique (Curtis *et al.*, 1986). Cet

antibiotique bactérien, isolé de *Streptomyces griseus*, inhibe l'activité peptidyl transférase de la sous unité ribosomale 60S des eucaryotes. Il nous permet de suivre le devenir d'un pool de protéines nouvellement synthétisées en présence de différents traitements.

X/ Extraction protéique

A. Extraction avec le tampon RIPA

A la fin de chaque traitement, les cellules sont placées sur la glace, lavées deux fois avec du PBS froid dans lequel elles sont ensuite resuspendues. L'extraction protéique est réalisée avec le tampon RIPA pH 8 (NaCl 150mM, Tris-HCl 20mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1% et déoxycholate de sodium 0,5%) contenant des inhibiteurs de protéases (2mg/mL de iodoacétamide, 1mM de PMSF et 10µg/mL du mélange leupeptine et pepstatine) (*Sigma*, France) pendant 20min à 4°C. Les noyaux et les cellules non solubilisées sont ensuite culottés par centrifugation (15000xg, 15min à 4°C) ; le surnageant est prélevé et dénaturé par ajout de LSB 2X final (2.5% SDS, 15mg/mL dithiothreitol (DTT), 12mM Tris-HCl pH 6,8, 5mM EDTA pH 7, 3,5% Glycérol, 0,01% bleu de bromophénol), puis par chauffage 5min à 50°C.

B. Extraction avec le tampon Agrégat

Le RIPA permet de solubiliser toutes les protéines, même celles qui sont agrégées. Il est donc nécessaire d'utiliser un autre protocole de solubilisation qui permet de distinguer entre les deux états, agrégées ou non agrégées, des protéines. Le niveau d'agrégation est déterminé par une double extraction des protéines. La première est réalisée avec un tampon de solubilisation appelé Tampon I (10mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM EDTA et 1% Triton X-100) contenant les inhibiteurs de protéases. Le culot de cellules est resuspendu dans 50µL de Tampon I puis incubé 20min à 4°C. Les noyaux et les cellules non solubilisées sont ensuite culottés par centrifugation (15000xg, 15min à 4°C). Le surnageant est dénaturé par ajout de LSB 2X final, puis par chauffage 5min à 50°C. La deuxième se fait par reprise du culot dans 50µL de Tampon II (1% SDS, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glycérol) contenant les inhibiteurs de protéases puis mis à chauffer pendant 10min à 65°C. L'ADN est culotté par centrifugation (15000xg, 15min à 4°C). Le surnageant, auquel est ajouté du LSB 2X final, est chauffé à 55°C pendant 5min. Après analyse par immunodétection, la protéine est considérée comme agrégée si elle apparaît dans la deuxième extraction.

XI/ Dosage protéique

La concentration protéique des différents échantillons est déterminée par un dosage colorimétrique (BCA Protein Assay, Pierce, France). Cette méthode utilise l'acide bicinchoninique (BCA) comme réactif de détection des ions Cu^+ , qui se forment lorsque les ions Cu^{2+} sont réduits par les protéines dans un environnement alcalin. Un produit de réaction violet possédant une forte absorbance à 562nm est alors formé. Après l'extraction protéique, 5 μL d'échantillon à doser sont ajoutés au mélange réactionnel contenant 45 μL d'eau distillée et 50 μL de SDS 1%. La solution contenant les réactifs A et B (ratio : 50mL de A pour 1mL de B) est ajoutée à raison de 1mL par tube. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30min puis l'absorbance à 562 nm est mesurée. Le calcul de la concentration en protéines des échantillons se fait grâce à la courbe de calibration précédemment réalisée avec la fraction V de l'albumine de veau.

XII/ Détermination du profil glycosidique

Le niveau de maturation des protéines N-glycosylées, comme CFTR, peut être déterminé par digestion avec diverses endoglycosidases. En effet, les protéines nouvellement synthétisées sont glycosylées au niveau du résidu asparagine au cours de leur biosynthèse. L'endoglycosidase H (Endo H) est une enzyme qui clive les N-glycannes riches en mannose ou hybrides après le premier résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc) lié à l'asparagine. La peptide:N-glycosidase F (PNGase F) est une amidase qui clive les oligosaccharides riches en mannose, hybrides et complexes entre le GlcNAc et l'asparagine (**Figure M5**).

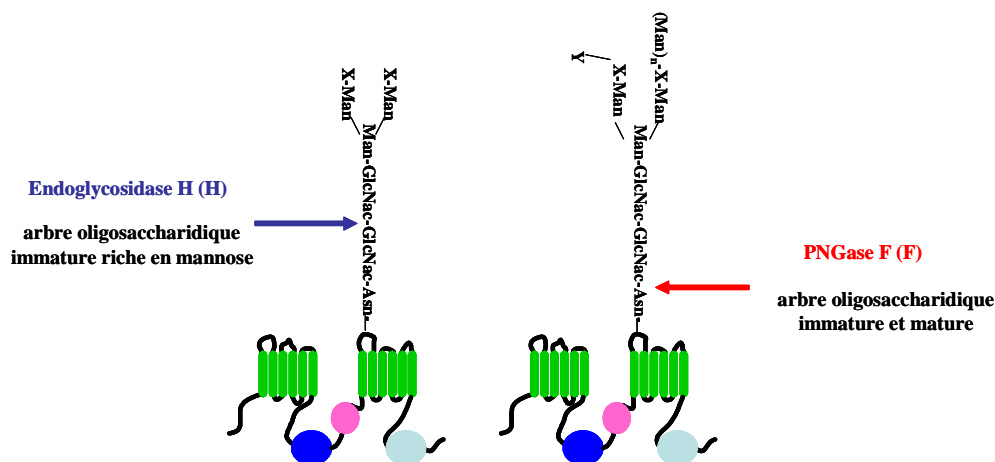


Figure M5: Schéma représentant les sites de coupure de l'Endo H et de la PNGaseF.

Dans les deux cas, la réaction est réalisée sur 100µg d'extraits protéiques comme décrit par le fabricant (*New England BioLabs*, France). Brièvement, 100µg d'extraits protéiques sont incubés pendant 10min à 37°C dans du tampon de dénaturation. Le pH de la réaction est, par la suite, ajusté avec du tampon G5 (0,5M citrate de sodium, pH 5,5) pour l'Endo H ou avec le tampon G7 (0,5M phosphate de sodium, pH 7,5) pour la PNGase F. Pour cette enzyme, 1% NP-40 final est ajouté. Les échantillons sont ensuite incubés avec l'Endo H (7µg/mL) ou la PNGase F (31µg/mL) pendant 3h à 37°C. Finalement, les échantillons sont dénaturés 5 min à 50 °C dans du LSB 2X final et conservés à -80 °C.

XIII/ Immunoprécipitation de la protéine CFTR-F508del

A la fin du traitement, les protéines sont extraites selon la méthode décrite dans le paragraphe X/A. Le lysat cellulaire est séparé en deux.

1°/ 10% sont mélangés avec 27µL d'eau et 8µL de LSB 10X pour contrôler l'expression de la protéine.

2°/ Les 90% restant sont utilisés pour l'immunoprécipitation. Cet échantillon est incubé avec 2µL du mélange de deux anticorps anti-CFTR (L12B4 et M3A7) dans 1mL de RIPA contenant les inhibiteurs de protéases. Ce mélange est incubé à 4°C sous agitation pendant 2h minimum. Après l'ajout de protéines G-sépharose préalablement rincées trois fois avec du RIPA, le mélange est remis sous agitation à 4°C pendant 1h. Le complexe protéines G-Anticorps-CFTR est rincé 5 fois avec 1mL de RIPA. Les protéines sont ensuite éluées dans 40µL de LSB 2X contenant 10% de β-mercaptoéthanol pendant 15 min à 37°C.

La séparation des protéines se fait par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE), et est réalisée selon la technique de Laemmli (Laemmli, 1970).

XIV/ Electrophorèse et immunodétection

La séparation de la protéine CFTR sauvage (~170 kDa) ou CFTR-F508del (~140 kDa) en condition dénaturante (SDS-PAGE) est réalisée sur un gel d'acrylamide à 7%. Les protéines sont séparées pendant 20min à 60V puis 2h à 140V, en présence de tampon de migration (Tris-HCl 25mM pH 8,3 contenant 192mM de glycine et 0,1% SDS). La protéine

TCRC α -HA (~41 kDa) ainsi que les protéines chaperonnes sont séparées par SDS-PAGE sur gel d'acrylamide à 12% pendant 20min à 60V puis 1h de migration à 140V.

Ces protéines sont, par la suite, transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 μ m de porosité ; *Biorad*, France) durant 120min à 100V et à 4°C dans le tampon de transfert (Tris-HCl 25mM pH 8,3 contenant 192mM de glycine et 20% de méthanol). L'immunodétection est réalisée après saturation des sites non spécifiques au niveau de la membrane de nitrocellulose par le tampon de blocage (PBS, 5% de lait écrémé, 0,1% Tween 20) pendant la nuit à 4°C sous agitation. L'incubation avec les anticorps monoclonaux anti-HA (*Covance*, USA) ou anti-CFTR (*Chemicon*, USA) est réalisé à TA pendant 1h. La détection du complexe anticorps-antigène se fait grâce à un anticorps secondaire marqué à la peroxydase et à une réaction de chimiluminescence (Kit ECL Western Blotting, *Amersham Biosciences*, France) (**Tableau MIII**).

Tableau MIII: liste des différents anticorps utilisés pour l'étude et de leur fournisseur

Anticorps	Fournisseur
Anti-CFTR L12B4 (épitope: N386-A412)	Chemicon (USA)
Anti-CFTR M3A7 (épitope : D1370-T1380)	Chemicon (USA)
Anti-HA	Covance (Angleterre)
Anti Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Developmental Studies Hybridoma Bank (USA)
Anti calnexine (CNX)	StressGen (USA)
Anti BiP	StressGen (USA)
Anti Hsp70	StressGen (USA)
Anti Hsp90	StressGen (USA)
Anti 20S α 3	Biomol (USA)
Anti ubiquitine (Ub)	Biomol (USA)

La quantification de l'intensité de la bande est réalisée à l'aide du logiciel SCION (*Scion Corporation*, USA) puis l'intensité de chaque bande est ramenée en pourcentage par rapport à la quantité de départ.

XV/ Mesure de l'activité du protéasome

Le protéasome comporte trois activités enzymatiques (trypsin-like, PGPH pour peptidylglutamyl peptide hydrolyzing et chymotrypsin-like) qu'il est possible de mesurer individuellement à l'aide du 4-methylcoumarinyl-7-amide (AMC), un fluorophore (λ_{ex} =

350nm et $\lambda_{em} = 440nm$) lié au substrat spécifique de chaque activité enzymatique (**Tableau MIV**). L'analyse est basée sur la détection de l'AMC libre après l'hydrolyse du substrat-AMC par le protéasome.

Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid. Après grattage, les cellules sont culottées par centrifugation pendant 1min, puis resuspendues dans 100 μ L de PBS contenant 0,1% de Triton X-100 et cassées à l'aide d'un potter. Les cellules intactes et les noyaux sont éliminés par centrifugation à 13200 \times g pendant 15min. Le surnageant est alors divisé en deux : 5 μ L pour le dosage protéique et 95 μ L pour la mesure d'activité. Dans un tube de 0,5mL, le mélange suivant est effectué : 50 μ g de protéine de l'échantillon, 12 μ L du substrat à 1,25mM et complété à 150 μ L avec le tampon A (25mM Tris HCl pH 7,6, 6mM KCl, 6mM MgCl₂, 20% glycérol). Un témoin sans échantillon est également préparé pour chaque substrat. Le mélange ainsi obtenu est incubé à 37°C pendant 1h à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par l'ajout de 5% (7,5 μ L) d'acide trichloroacétique (TCA) dans chaque échantillon puis incubée 2h à TA, dans l'obscurité. Les échantillons sont centrifugés 5min à 13200 \times g pour éliminer d'éventuels corps d'agrégat. 60 μ L de chaque tube sont prélevés et mélangés à 200 μ L de Tris 500mM pH 8,0. Les mesures de fluorescence sont réalisées avec les paramètres suivant : $\lambda_{ex} = 350nm$ et $\lambda_{em} = 440nm$.

Tableau MIV: Substrats des activités du protéasome.

Séquences peptidiques	Activités	Aliquoté en 100 μ L ; Ci
Cbz-leu-leu-glu-AMC	PGPH	1,25mM
N-cbz-gly-gly-arg-AMC	Trypsin-like	1,25mM
N-suc-leu-leu-val-tyr-AMC	Chymotrypsin-like	1,25mM

XVI/ Préparation des fractions enrichies en RE

L'isolement de la fraction microsomale est réalisé par deux méthodes afin de contrôler nos résultats : la centrifugation différentielle et le fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose.

A. Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle se fait à partir de cellules à confluence dans des boîtes de 15 cm. Toutes les étapes suivantes se font à 4°C. Après un lavage au PBS froid, les cellules

sont resuspendues dans 5mL de tampon d'homogénéisation pH 7,4 (10mM Hepes, 1mM EDTA et 0,25M sucrose). Puis, les cellules sont culottées par centrifugation à 2000xg pendant 5min. Le culot est resuspendu dans 3mL de tampon d'homogénéisation contenant les inhibiteurs de protéases (2mg/mL de iodoacétamide, 1mM de PMSF et 10µg/mL du mélange leupeptine et pepstatine), puis les cellules sont cassées par 20 aller-retours avec l'homogénéisateur de Dounce. Les cellules non cassées, ainsi que les noyaux, sont éliminés par centrifugation à 600xg pendant 10min. Le surnageant est transvasé dans un tube à centrifugation, tandis que la fraction contenant les noyaux (FN) est resuspendue dans 500µL de tampon de dégradation (125mM potassium acétate, 2,5mM magnésium acétate, 10mM glucose, 1mM DTT, 25mM Hepes pH 7,2). Les mitochondries sont sédimentées par centrifugation à 15000xg pendant 5min; le culot est resuspendu dans 500µL du tampon de dégradation. Les microsomes et la fraction soluble, contenus dans le surnageant, sont séparés par ultracentrifugation (100000xg, 1h à 4°C). Le culot contient alors les microsomes ou fraction microsomale (FM). Cette dernière est resuspendue dans le tampon de dégradation. Le surnageant est ultracentrifugé à 300000xg pendant 2h afin de séparer la fraction ribosomale contenue dans le culot et le cytosol ou fraction cytoplasmique (FC) contenu dans le surnageant. Les différentes fractions sont congelées à -80°C après prélèvement de 5µL pour le dosage protéique.

B. Fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose

Les cellules à confluence sont d'abord lavées avec du PBS froid puis grattées et culottées par centrifugation (3000xg, 5min à 4°C). Le culot cellulaire est repris dans un volume de tampon d'homogénéisation (10 mM Hepes, 1mM EDTA et 0,25M sucrose, pH 7,4), contenant les inhibiteurs de protéases (2mg/mL de Iodoacétamide, 1mM de PMSF et 10µg/mL du mélange leupeptine et pepstatine), correspondant à 5 fois le volume de cellules. Les cellules sont cassées par 30 aller-retours au potter, puis l'homogénat est passé dans une aiguille de diamètre 25G pour permettre une lyse plus importante des cellules. Après deux passages, l'homogénat cellulaire est centrifugé à 2500xg pendant 5min à 4°C pour sédimenter les cellules intactes et les noyaux. Le surnageant est centrifugé à 8000xg pendant 10min à 4°C pour culotter les mitochondries. Les culots obtenus lors des centrifugations sont resuspendus dans 1mL de tampon d'homogénéisation puis plongés dans l'azote liquide avant d'être congelé à -80°C pour les mesures d'activités. Le surnageant obtenu est déposé sur un gradient de sucrose qui permet la séparation des différents organites.

Les gradients de sucrose sont préparés 2h avant le fractionnement afin de les laisser se stabiliser à 4°C. Les différentes solutions de sucrose sont préparées comme indiqué dans le **tableau MV**, avec les inhibiteurs de protéases. Pour réaliser le gradient, nous déposons successivement 3mL de tampon à 2M puis 9mL de tampon à 1,3M puis 9mL de tampon à 1M puis 3mL de tampon à 0,6M et enfin 3mL de tampon à 0,5M.

A la fin de la dernière centrifugation, les fractions à séparer sont déposées à la surface du gradient puis les tubes sont délicatement placés dans le rotor SW28. La séparation se fait à 130000xg pendant 3h à 4°C. Après centrifugation, les fractions de 1mL sont récoltées de la plus dense à la moins dense. Les fractions sont aussitôt congelées dans l'azote liquide pour éviter toute dégradation. Les fractions sont conservées à -80°C avant d'effectuer les tests d'activité enzymatique.

Tableau MV: Composition des différentes solutions de sucrose contenues dans le gradient discontinu.

Concentration en sucrose (M) du tampon Hepes 10mM et 1mM EDTA (pH 7.4)	Volume de tampon à prélever (mL)	Volume d'inhibiteurs de protéase (µL)
2	2 x 4	96
1,3	2 x 10	240
1	2 x 10	240
0,6	2 x 4	96
0,5	2 x 4	96

C. Test d'activité enzymatique sur les fractions

Afin de vérifier la pureté des fractions, des tests d'activité enzymatique (AE) des marqueurs des différents compartiments cellulaires ont été réalisés. Ainsi, nous avons utilisé la phosphatase alcaline pour la membrane plasmique, la β -glucuronidase pour les lysosomes, l' α -mannosidase II pour le Golgi et l' α -glucosidase pour le RE. Pour évaluer l'activité de chaque enzyme, des substrats fluorescents sont utilisés (**Tableau MVI**), puis, l'activité spécifique (AS) de chaque enzyme pour chaque fraction a été calculée à l'aide de la formule suivante : $AS = AE_{\text{fraction}} / [\text{protéine}]_{\text{fraction}}$

Après la détermination des fractions enrichies en RE, le sucrose a été éliminé par centrifugation différentielle. Brièvement, les fractions sont diluées deux fois dans du tampon d'homogénéisation puis centrifugées à 100000xg pendant 1h à 4°C. Le culot contient alors la fraction microsomale enrichie en RE (FRE) qui est resuspendue dans le tampon de dégradation et congelée à -80°C.

Tableau MVI: Dosages d'activité enzymatique pour les fractions obtenues après séparation sur gradient de sucrose.

Phosphatase alcaline (marqueur de la membrane plasmique)			
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Réactif (10mL de 0,5M Tris-HCl pH 9,2, 10mL de Triton X-100, 6mL de MgCl₂ 0,1M, 44mL d'H₂O) ➤ substrat : p-Nitrophenylphosphate (60mM) 			
Réactif	Concentration	Vol (μL)	1. Incuber les échantillons pendant 2h à 37°C 2. Mesurer la densité optique (DO) à 410nm
Echantillon		100	
Eau		200	
Solution réactive		700	
Substrat	5,4mM	100	
β-Glucuronidase (marqueur des lysosomes)			
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 1% Triton X-100 ➤ 1M CH₃CO₂Na (pH 4,5) ➤ substrat : 4-Méthylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosamidine (20mM) ➤ 0,1M de 2-Méthulaminopropanol (AMP) dans 40mM HCl 			
Réactif	Concentration	Vol (μL)	1. Incuber les échantillons pendant 30min à 37°C 2. Arrêter la réaction avec 1mL de la solution d'AMP 3. Mesurer l'intensité de fluorescence $\lambda_{ex} = 360nm$ $\lambda_{em} = 460nm$
1% Triton X-100	0,1%	30	
1M CH ₃ CO ₂ Na (pH 4,5)	0,1M	30	
Echantillon		40	
Eau		180	
Substrat	1,3mM	20	
α-Mannosidase (marqueur du Golgi)			
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 1% Triton X-100 ➤ PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ ➤ substrat : 4-Méthylumbelliferyl-α-D-mannopyranoside (40mM) ➤ 0,1M de 2-Méthulaminopropanol (AMP) dans 40mM HCL 			
Réactif	Concentration	Vol (μL)	1. Incuber les échantillons pendant 30min à 37°C 2. Arrêter la réaction avec 1mL de la solution d'AMP 3. Mesurer l'intensité de fluorescence $\lambda_{ex} = 365nm$ $\lambda_{em} = 450nm$
1% Triton X-100	0,1%	30	
Echantillon		30	
PBS		200	
Substrat	4mM	30	
α-Glucosidase (marqueur du RE)			
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tampon citrate/phosphate (150mM, pH 6,5) ➤ substrat : 4-Méthylumbelliferyl-α-D-glucoside (20mM) ➤ 0,1M de 2-Méthulaminopropanol (AMP) dans 40mM HCL 			
Réactif	Concentration	Vol (μL)	1. Incuber les échantillons pendant 30min à 37°C 2. Arrêter la réaction avec 1mL de la solution d'AMP 3. Mesurer l'intensité de fluorescence $\lambda_{ex} = 360nm$ $\lambda_{em} = 460nm$
Echantillon		20	
Tampon		200	
Substrat	0,9mM	10	

D. Traitements des microsomes par le carbonate de calcium (Na_2CO_3) ou l'iodure de potassium (KI)

La FM et la FRE, obtenue respectivement, par centrifugation différentielle ou par fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose, sont resuspendues dans 200 μL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 0,1M pH 11,5 ou d'iodure de potassium (KI) à 250mM. Ces deux composés sont des agents chaotropiques qui, en détruisant les liaisons électrostatiques, permettent le détachement des protéines liées directement ou indirectement au RE. Le mélange est incubé 30min dans la glace pour décrocher les protéines périphériques. Une centrifugation à 100000 $\times g$ pendant 1h à 4°C permet de culotter la fraction microsomale, qui est immédiatement resuspendue dans le tampon de dégradation et congelée à -80°C, alors que les protéines associées au RE sont récupérées dans le surnageant. Ces dernières sont précipitées par ajout de 20% de TCA puis sédimentées par centrifugation à 16000 $\times g$ pendant 15min à 4°C. Le culot est lavé avec de l'acétone et les protéines sont culottées par une nouvelle centrifugation, puis suspendues dans le tampon de dégradation.

E. Etude de la dégradation *in vitro* de CFTR-F508del

L'étude de la dégradation se fait à partir de 40 μg de FM ou FRE. Les microsomes sont incubés avec la CHX (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et les inhibiteurs pendant 4h à 37°C. L'échantillon est ensuite dénaturé par ajout de LSB 2X final et chauffage 5min à 50°C. Le témoin correspond aux microsomes dénaturés dans le LSB 2X final sans incubation préalable.

F. Spectrométrie de masse

Les microsomes obtenus par fractionnement subcellulaire ont été étudiés par spectrométrie de masse en collaboration avec le laboratoire de Jérôme Garin (Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes, CEA-Grenoble). Une fois les échantillons obtenus (microsomes, microsomes traités, protéines périphériques), les protéines sont dénaturées par ajout de LSB10X puis les échantillons sont transmis pour analyse.

XVII/ Protéolyse ménagée

70µg de protéines des microsomes ont été digérés par 20µg de trypsine en présence ou non de 0.05% TritonX-100 pendant 15 min à 4°C. La réaction est arrêtée par 1mM de PMSF puis les protéines sont dénaturées 20 min à 37 °C dans du LSB 2X

XVIII/ Immunolocalisation cellulaire

A. Principe général

Dans la technique d'immunofluorescence indirecte, l'immunomarquage permet de localiser un antigène dans un tissu ou dans une cellule à l'aide d'un anticorps spécifique puis un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (**Figure M6**). La fluorescence est ensuite détectée à l'aide de microscopie classique ou de microscopie confocale. Dans la technique de fluorescence directe, la protéine d'intérêt est fusionnée à une protéine auto-fluorescente (exemple : la GFP ou le DsRed).

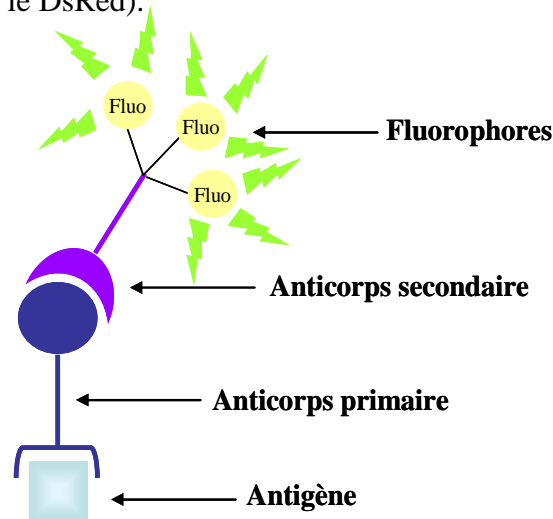


Figure M6: Principe de l'immunofluorescence indirecte.

B. Protocole d'immunomarquage

Pour les expériences d'immunolocalisation, les cellules sont cultivées sur des lamelles de 12mm de diamètre. La localisation cellulaire de la protéine CFTR-F508del-HA est obtenue après fixation des cellules pendant 20 min à TA par le paraformaldéhyde à 4%. Après fixation, les cellules sont perméabilisées avec 0,2% de Triton X-100 pendant 5min et la lamelle est saturée avec le tampon de blocage (0,5% BSA dans du PBS contenant 0.1mM de Ca^{2+} et 2mM Mg^{2+}). L'incubation successive avec l'anticorps primaire anti-HA (1/1000, 1h à TA) et l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au FITC (*Jackson ImmunoResearch*,

USA) nous permet de détecter au niveau cellulaire le complexe anticorps-antigène fluorescent par l'utilisation d'un microscope à fluorescence, après montage lamelle/lame en présence d'un milieu approprié contenant du DAPI (Vectashield® avec DAPI, Abcys, France)

C. Microscope à épifluorescence

L'observation de la fluorescence est rendue possible grâce à l'utilisation du microscope inversé à fluorescence (Axiovert 200M, Zeiss, France). Ce microscope est équipé d'un jeu de filtre permettant la détection du DAPI ($\lambda_{\text{excitation}}= 359\text{nm}$ et $\lambda_{\text{émission}}= 461\text{nm}$), du FITC ($\lambda_{\text{ex}}= 488\text{nm}$ et $\lambda_{\text{em}}= 530\text{nm}$), du YFP ($\lambda_{\text{ex}}= 520\text{nm}$ et $\lambda_{\text{em}}= 532\text{nm}$) et du TRITC ($\lambda_{\text{ex}}= 544\text{nm}$ et $\lambda_{\text{em}}= 572\text{nm}$) et d'une caméra (AxioCam MRm, Zeiss, France) permettant l'acquisition d'image avec l'objectif à immersion 63x (X 63/1,35 Zeiss, France). Les images sont, par la suite, analysées avec le logiciel AxioVision 4.2 (Zeiss, France).

D. Microscopie confocale

Le microscope confocal, utilisant le laser pour balayer la surface d'intérêt, permet de visualiser, à l'aide de fluorochromes, des protéines au niveau cellulaire et tissulaire. La technique d'imagerie confocale à fluorescence permet d'obtenir des images de grande résolution grâce à des coupes « optiques » de l'échantillon obtenues par une projection sur l'axe Z. Basée sur l'élimination des signaux de fluorescence provenant des régions situées en dehors du plan focal, cette technique donne ainsi accès à des informations situées à l'intérieur des cellules. Le système disponible au sein de l'institut est un Leica TCS SP2. Il est équipé de deux lasers : un UV et un Argon permettant d'obtenir 8 raies d'excitation (351, 354, 458, 476, 488, 514, 543 et 633 nm), couvrant ainsi tout le spectre d'excitation. L'objectif utilisé est un 63X à immersion. L'acquisition de la fluorescence, la reconstitution des images et les échelles sont données par le logiciel contrôlant le système : Leica confocal software (Leica, France)

XIX/ Obtention et quantification des ARNm de CFTR

A. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux se fait avec le kit de Promega (France). Les boîtes de culture, préalablement placées sur la glace, sont lavées avec du PBS. Puis les cellules sont

lysées par ajout de 900µL de la solution dénaturante. Le lysat est transvasé dans un eppendorf froid. 90µL d'acétate de sodium sont ajoutés au tube puis mélangés 4-5 fois. 900µL de phénol-chloroforme sont ajoutés et le tube est mélangé 3-5 fois avant d'être agité vigoureusement. Les tubes sont placés dans la glace pendant 15min. La solution est centrifugée à 10000xg pendant 20min à 4°C. La phase aqueuse qui contient les ARN est récupérée et un volume égal d'isopropanol est ajouté au mélange. Une incubation à -20°C pendant 5min permet de faire précipiter les ARN. Une centrifugation de 10min à 10000xg à 4°C permet de culotter l'ARN qui est lavé avec 1mL d'éthanol 70% froid sans le décoller. Après une nouvelle centrifugation à 10000xg pendant 10min à 4°C, l'éthanol est aspiré et le culot d'ARN, une fois séché, est repris dans 50µL d'eau DEPC 0,05%. La concentration, déterminée par lecture de la densité optique à 260nm, est ramenée à 1 µg/µL.

B. Transcription inverse des ARNm

La transcription inverse (kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase ; *Invitrogen*, France) se fait dans un volume final de 20µL avec 3µg d'ARN totaux à 4°C. Dans un eppendorf stérile, 0,5µg d'amorces oligo(dT)₁₂₋₁₈ (qui se fixent à la queue polyA des ARNm), 3µg d'ARNm, 10mM de dNTP sont complétés à 12µL avec de l'eau DEPC 0,05%. Le mélange est chauffé à 65°C pendant 5min puis remis rapidement dans la glace. Les composants suivants du kit sont ensuite ajoutés : 4µL du 5X First-Strand Buffer et 2µL 0,1M DTT. Le mélange est incubé à 42°C pendant 2min et 1µL de la SuperScript™ II RT est ajouté ; le tout est incubé à 42°C pendant 50min. La réaction est arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15min. 1µL du produit de la transcription inverse est prélevé pour déterminer la concentration en ADNc par mesure de l'absorbance à 260nm puis est ramené à 1µg/µL.

C. PCR semi-quantitative

La PCR semi-quantitative constitue une alternative à la PCR quantitative. En effet en utilisant un standard interne (dans notre cas la β-actine) que nous amplifions en parallèle du gène d'intérêt (CFTR), nous pouvons calculer un coefficient R (quantité CFTR/quantité β-actine) qui nous indique le niveau d'expression du gène *CFTR*.

Les conditions expérimentales sont les suivantes. Après dénaturation des brins d'ADNc qui pourraient être encore hybridés avec l'ARNm à 95°C pendant 2min, la réaction se déroule sur 34 cycles de trois étapes : dénaturation à 95°C pendant 30s, hybridation des amorces oligonucléotidiques à la matrice à 60°C pendant 2min et élongation à 72°C pendant

1min grâce à l'ADN polymérase Taq (*Invitrogen*, France). Au 34^{ème} cycle, la dernière étape est prolongée de 3 min, ce qui permet de finaliser l'élongation et l'hybridation.

Le mélange de PCR est le suivant :

- 35µL H₂O stérile
- 5µL tampon Taq 10X
- 4µL MgCl₂ (2mM final)
- 1µL dNTP 10mM
- 0,5µL de chaque amorce (**Tableau MVII**)
- 5 µL ADNc au préalable chauffé à 95°C pendant 10min (20µL de RT + 30µL H₂O)
- 1µL de Taq polymérase
- Prélever des aliquots de 9µL à 18, 22, 26,30 et 34 cycles (+1,4µL tampon de charge 6X) qui seront déposés sur gel

La migration se fait sur un gel d'agarose à 2% préparé avec du TAE (Tris-acétate 400mM, EDTA 10mM, pH 8,3) et contenant du BET (Bromure d'Ethidium, molécule intercalante des bases des acides nucléiques, visualisée sous UV) pendant 25min à 110V. Après révélation sous la lumière UV du BET, l'intensité de chaque bande est quantifiée pour calculer le coefficient R. Ce dernier correspond à l'intensité de la bande de CFTR divisée par l'intensité de la bande de la β-actine pour un temps donné.

Tableau MVII: Liste des amorces utilisées pour la PCR semi-quantitative.

	CFTR	β-actine
amorce sens	5'-AGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTC-3'	5'- CCACTGGCATTGTGATGGACTC -3'
amorce anti-sens	5' GTGCCAATGCAAGTCCTTCATCAA- 3'	5'- AGGAAGGAAGGCTGGAAAAGGG -3'

Résultats

A ce jour il est admis que la protéine CFTR-F508del est dégradée principalement par la voie ubiquitine/protéasome, après retranslocation dans le cytoplasme *via* le translocon Sec61. Cette voie de dégradation, avec celle des lysosomes, constitue le principal système de protéolyse ATP-dépendant pour les protéines membranaires et les protéines de sécrétion. Cependant, de nombreuses études suggèrent la participation d'autres voies de dégradation dont la nature reste encore inconnue. Ainsi, au cours de mon doctorat, j'ai essayé de mettre en évidence l'existence de voies de dégradation, *in vivo*, participant, en plus de la voie ubiquitine/protéasome, à la dégradation de la protéine CFTR-F508del.

Voici un résumé détaillé de l'ensemble des résultats obtenus et qui font l'objet de deux manuscrits en cours de publication.

I/ La protéine CFTR-F508del dans les cellules BHK-21

A. Expression et localisation

Pour réaliser notre étude, nous avons utilisé la lignée cellulaire BHK-21 exprimant de façon stable les protéines CFTR sauvage et mutée (F508del). Ces deux protéines sont fusionnées au niveau de leur partie C-terminale à l'étiquette HA (Haardt *et al.*, 1999).

Nous avons, dans un premier temps, vérifié par immunodétection le niveau et le profil d'expression de ces deux protéines (**Figure R1 A**). L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-HA et anti-CFTR (L12B4 et M3A7) nous ont permis de détecter la présence de la protéine CFTR sauvage, caractérisée par ces deux formes : mature ou complexe-glycosylée (170kDa ; flèche pleine) et immature ou core-glycosylée (140kDa ; flèche vide). Ces mêmes anticorps ont aussi révélé la présence de la protéine CFTR-F508del sous sa forme immature de 140kDa (flèche vide). Ces résultats montrent tout d'abord que les trois anticorps reconnaissent les mêmes formes, ensuite, que la présence de l'étiquette HA ne change pas le profil d'expression de ces deux protéines. Et finalement, ces résultats mettent en évidence une différence de niveau d'expression entre les protéines CFTR sauvage et mutée comparable à ce qui a été observé précédemment (Haardt *et al.*, 1999). En effet, par rapport à la protéine CFTR sauvage, CFTR-F508del est environ neuf fois moins exprimée, pour une même quantité de protéine déposée (**Figure R1 A**). Ce résultat est comparable à ce qui a été décrit pour la protéine mutée endogène (Stutts *et al.*, 1993). Pour vérifier que nous avons déposé la même quantité de protéines dans tous les puits, nous avons immunodétesté la sous-unité α de

la Na^+/K^+ -ATPase. Son niveau d'expression comparable entre les différents puits indique que les résultats obtenus ne sont pas l'effet d'une différence de charge protéique.

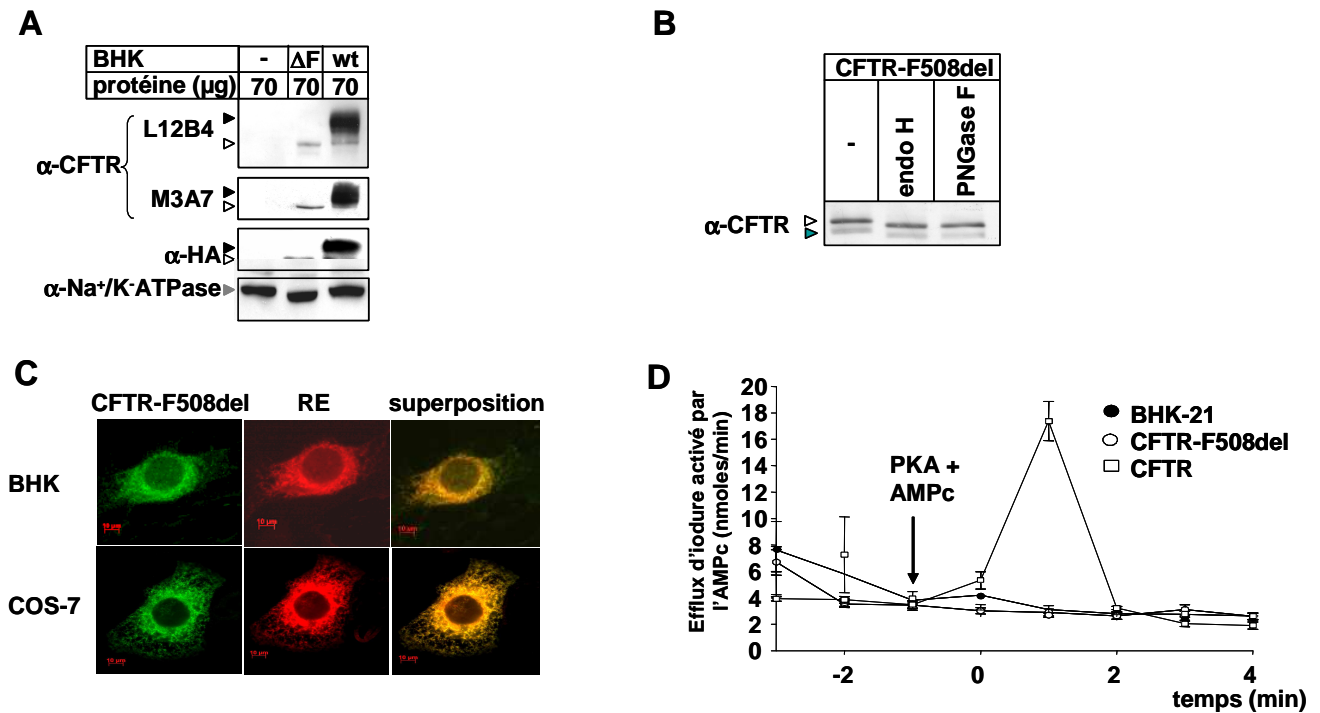


Figure R1: Expression, localisation et fonction des protéines CFTR sauvage et mutée.

A: Expression basale des protéines CFTR sauvage et mutée. Les extraits cellulaires totaux sont préparés à partir de cellules BHK-21 exprimant de façon stable ces deux protéines. Le niveau d'expression a été examiné par séparation sur gel SDS-PAGE à 7%, électro-transfert sur membrane de nitrocellulose puis immunodétection par les anticorps primaires monoclonaux anti-HA et anti-CFTR (M3A7 et L12B4) et révélation par chimiluminiscence (ECL). La flèche verte indique la forme non glycosylée de CFTR, la flèche vide la forme immature et la flèche pleine la forme mature. L'anticorps monoclonal anti- Na^+/K^+ -ATPase détecte la sous-unité α utilisée comme standard interne.

B: Profil de glycosylation de la protéine CFTR-F508del. Les extraits protéiques, préparés à partir de cellules BHK-21 exprimant de façon stable la protéine CFTR-F508del, ont été traités soit par l'endoglycosidase H (endo H) soit par la PNGase F. Le profil électrophorétique a été déterminé par immunodétection en utilisant l'anticorps anti-CFTR (L12B4).

C: Localisation de la protéine CFTR-F508del par immunofluorescence. Les cellules BHK-21 et COS-7, exprimant CFTR-F508del de manière stable et transitoire respectivement, sont fixées, perméabilisées et co-marquées indirectement en utilisant l'anti-HA et directement par auto-fluorescence de la protéine DsRed-ER, marqueur spécifique du RE. La révélation de l'anti-HA est obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à la fluorescéine. Les photographies ont été obtenues grâce à la microscopie confocale (système d'imagerie LEICA TCS SP2 avec un objectif 63X/1,35 à immersion).

D: Etude de la fonction des protéines CFTR sauvage et mutée par mesure de l'efflux d'iode. Les cellules BHK-21 exprimant de façon stable les protéines CFTR sauvage ou mutée ont été chargées durant 1h à TA par de l'iode (136mM). L'efflux a été mesuré grâce à une électrode sensible à l'iode avant et après stimulation par un cocktail de PKA et d'AMPc.

La forme immature de CFTR-F508del, observée par immunodétection, est caractéristique du RE. Dans ce compartiment, la protéine CFTR subit une N-glycosylation riche en mannose. Pour évaluer ce processus dans notre système d'expression hétérologue,

nous avons mesuré le niveau de glycosylation de CFTR-F508del (**Figure R1 B**). Pour cela nous avons utilisé deux endoglycosidases, l'endo H, enzyme qui clive les N-glycannes riches en mannose ou en formes hybrides après le premier résidu GlcNAc lié à l'asparagine et la PNGase F, une amidase qui clive les oligosaccharides riches en mannose, en formes hybrides et complexes entre le GlcNAc et l'asparagine. Pour ces deux endoglycosidases, nous observons une faible variation du poids moléculaire de CFTR-F508del, cependant indicative d'une glycosylation spécifique du RE. Ces résultats confirment aussi que, dans notre système d'expression, la protéine CFTR-F508del est exprimée uniquement sous forme immature.

Par la suite, nous avons examiné la localisation cellulaire de la protéine CFTR-F508del. En effet, d'après les résultats de l'immunodétection et de la glycosylation, cette protéine est exclusivement sous forme immature, caractéristique du RE (Lukacs *et al.*, 1993, Hammond *et al.*, 1994 ; Ware *et al.*, 1995). Ce résultat est en adéquation avec ce qui a été observé par de nombreuses équipes (Bebök *et al.*, 1998 ; Kopito, 1999 ; Kreda *et al.*, 2005). Cependant, il a été montré que CFTR-F508del est exprimée faiblement au niveau de la membrane plasmique des cellules primaires de l'épithélium pulmonaire (Cheng *et al.*, 1995; Kartner *et al.*, 1992). La même expression, plus importante dans les épithelia de souris homozygote pour F508del (Steagall et Drumm, 1999), dans l'intestin et la vésicule biliaire de patients mucoviscidosiques (Bronsveld *et al.*, 2000; Dray-Charier *et al.*, 1999 ; Kälin *et al.*, 1999) a été observée. Afin de déterminer le compartiment de localisation de la protéine CFTR-F508del dans notre système d'expression hétérologue, nous avons réalisé des expériences de colocalisation avec un marqueur spécifique du RE (**Figure R1 C**). Par fluorescence indirecte, en utilisant l'anticorps anti-HA reconnu par un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine, et fluorescence directe par autofluorescence du DsRed fusionné à la séquence de la calréticuline, protéine résidente de la lumière du RE, elle-même fusionnée à la séquence de rétention du RE (KDEL) (Okiyonedo *et al.*, 2004), nous avons observé que CFTR-F508del présente exclusivement une localisation réticulaire.

Pour mieux s'assurer que, dans les cellules BHK-21, nous n'avons pas de fuite de la protéine CFTR-F508del vers la membrane plasmique, comme il a déjà été décrit dans d'autres systèmes d'expression (Cheng *et al.*, 1995), nous avons mesuré l'efflux de l'iode après activation par la PKA et l'AMPc. Les résultats montrent que, par rapport à la protéine CFTR sauvage, l'expression de CFTR-F508del n'engendre aucun efflux d'iode, synonyme de l'absence de cette protéine au niveau de la membrane plasmique (**Figure R1 D**).

B. Dégradation de CFTR-F508del

Notre principal objectif est l'étude de la dégradation de la protéine CFTR-F508del. De nombreuses études ont suggéré que ce processus est localisé au niveau du cytoplasme et assuré par le système ubiquitine/protéasome. Cependant, d'autres observations sont en faveur d'une dégradation localisée au niveau du RE et médiée par des systèmes protéolytiques encore mal connus. Afin de mieux comprendre les voies de l'élimination rapide de CFTR-F508del, nous avons tout d'abord entrepris l'étude de sa dégradation dans les cellules BHK-21.

1- Détermination de la demi-vie de la protéine CFTR-F508del

Pour pouvoir déterminer le temps de disparition de 50% des protéines CFTR-F508del nouvellement synthétisées (demi vie ; $T_{1/2}$), nous avons utilisé la méthode du marquage métabolique à l'aide de l'isotope radioactif soufre 35 (^{35}S) incorporé au niveau des acides aminés méthionine (Met) et cystéine (Cys). Ce marquage permet de suivre une population de protéines nouvellement synthétisées au cours d'une période de chasse. Cette période fait suite à une phase de déplétion suivie d'une période de marquage. Nos résultats montrent que la $T_{1/2}$ est d' $\sim 30\text{min}$ (**Figure R2 A, B**). Le même résultat a été obtenu dans d'autres lignées cellulaires (Cheng *et al.*, 1990 ; Lukacs *et al.*, 1993 ; Ward et Kopito, 1994).

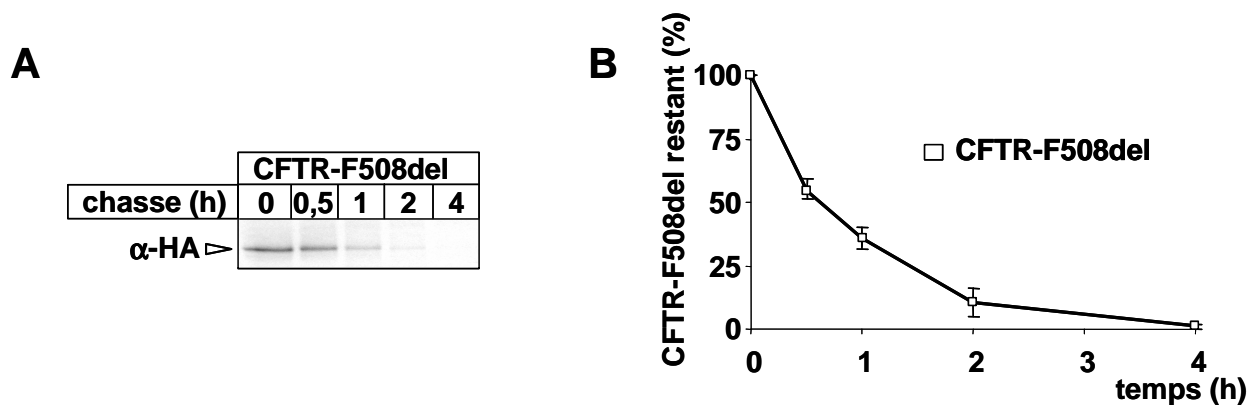


Figure R2: Détermination de la demi-vie de CFTR-F508del par marquage métabolique.

A: La disparition de CFTR-F508del a été suivie au cours de la période de chasse qui a suivie celle du marquage métabolique au soufre 35 (^{35}S). La protéine CFTR-F508del marquée a été immunoprécipitée par l'anti-HA et les protéines G-sépharose, puis séparée sur gel de 7%. Après révélation par autoradiographie, la quantité de radioactivité incorporée a été mesurée par phosphorimager. La flèche vide indique la forme immature.

B: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à $t=0$ en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne \pm S.E. ($n=5$).

2- Effet des inhibiteurs du protéasome sur la dégradation de CFTR-F508del

Pour caractériser la participation de la voie ubiquitine/protéasome, principalement celle de la sous-unité catalytique 20S du protéasome, dans la dégradation des protéines cibles, différents inhibiteurs sont utilisés (Rodgers et Dean, 2003). Cependant, leurs effets sont strictement liés à la vitesse de synthèse des protéines. Pour cette raison, leur utilisation s'accompagne souvent de l'apparition d'un corps cytoplasmique associé ou proche du noyau appelé « aggresome » (Wigley *et al.*, 1999 ; Kopito, 2000). Ce phénomène a été observé pour la protéine CFTR-F508del (Johnston *et al.*, 1998). Pour empêcher l'interférence de ce phénomène dans notre étude, nous avons utilisé la cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique, afin de suivre un pool de protéines nouvellement synthétisées. Cela nous permet ainsi de suivre la dégradation de CFTR-F508del.

☞ Effet de la cycloheximide sur la dégradation de CFTR-F508del

Les cellules BHK-21 exprimant stablement la protéine CFTR-F508del sont incubées en présence de la CHX (100µg/mL) en fonction du temps. Après immunodétection par l'anti-HA, nous avons observé que la $T_{1/2}$ est d'~ 30min. Ce résultat est comparable à celui obtenu par la méthode de marquage métabolique (**Figure R2, R3 A**). Ce résultat montre aussi que les protéines dont la $T_{1/2}$ est inférieure ou égale à 30min ne participent pas à la dégradation de CFTR-F508del.

☞ Effet des inhibiteurs du protéasome sur la dégradation de CFTR-F508del

Avant d'étudier l'effet des différents inhibiteurs du protéasome, nous avons cherché à montrer que l'utilisation de la CHX empêche l'apparition d'agrégat de CFTR-F508del.

Le traitement des cellules BHK-21 exprimant de manière stable la protéine CFTR-F508del avec de la lactacystine (Lac, 10µM) durant 16h entraîne l'apparition d'un corps périnucléaire correspondant à l'« aggresome » (**Figure R3 B, +Lac**). Cet effet est aboli en présence de la CHX (100µg/mL) (**Figure R3 B, CHX+Lac**). L'utilisation de la CHX seule durant la même période provoque une disparition quasi-totale de CFTR-F508del (**Figure R3 B, +CHX**). Au cours de ce traitement prolongé (16h) avec de la CHX, nous n'avons pas observé de mortalité cellulaire notable.

Ces résultats ont été confirmés par immunodétection (**Figure R3 C**). En présence de CHX seule ou de CHX additionnée de lactacystine, nous ne détectons pas la présence de la protéine mutée dans la fraction insoluble. Par contre, en présence de lactacystine seule, nous

observons la formation d'agrégat, avec l'apparition de la protéine dans les fractions solubles et insoluble.

L'ensemble de ces résultats montre que l'utilisation de la CHX permet d'étudier l'effet des inhibiteurs du protéasome indépendamment de la synthèse protéique et par conséquent de s'affranchir du phénomène d'agrégation. Ce procédé a été employé tout au long de notre étude.

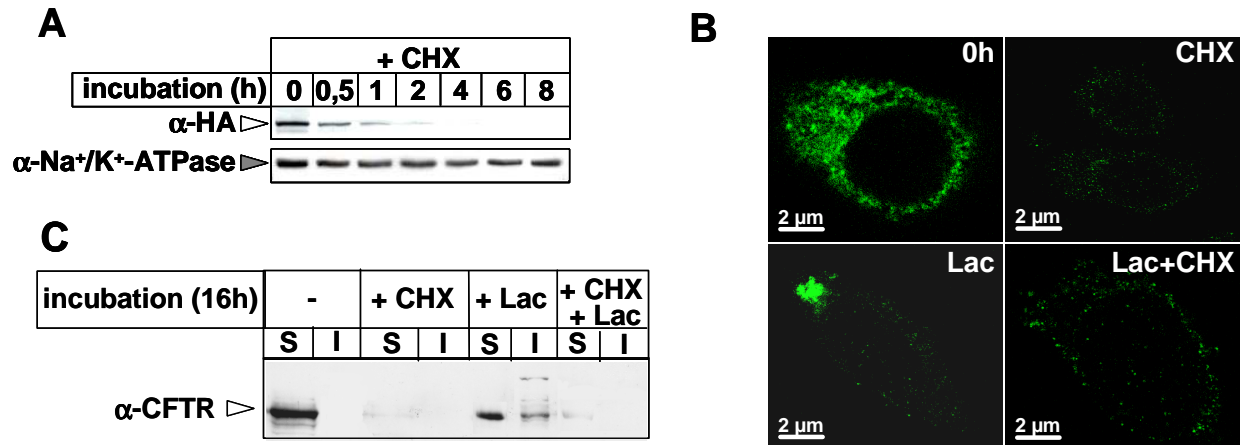


Figure R3: Dégradation de la protéine CFTR-F508del en présence de cycloheximide.

A: Détermination de la demi-vie de CFTR-F508del en présence de 100 μ g/mL de cycloheximide (CHX). La même quantité de protéine (70 μ g) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. L'anticorps monoclonal anti-Na⁺/K⁺-ATPase détecte la sous-unité α utilisée comme standard interne. La flèche vide indique la forme immature de CFTR.

B: Observation, par immunofluorescence, de l'effet de la CHX sur l'apparition d'agrégat de CFTR-F508del en présence de lactacystine (Lac, 10 μ M). Les cellules BHK-21 fixées et perméabilisées, sont marquées par l'anticorps anti-HA reconnu par l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la fluorescéine. Les photographies ont été obtenues grâce au système d'imagerie LEICA TCS SP2 avec un objectif 63X/1,35 à immersion.

C: Observation, par immunodétection, de la formation d'agrégat de CFTR-F508del en présence de CHX et/ou de lactacystine (Lac, 10 μ M). La même quantité de protéine (70 μ g) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-CFTR (L12B4) et le kit ECL.

L'utilisation de la lactacystine et du MG132, respectivement inhibiteur spécifique/irréversible (Fenteany *et al.*, 1994) et inhibiteur moins spécifique/réversible (Tsubuki *et al.*, 1996) du protéasome, a permis de mettre en évidence son rôle dans l'élimination rapide de CFTR-F508del (Jensen *et al.*, 1995 et Ward *et al.* 1995). Depuis, d'autres inhibiteurs plus spécifiques du protéasome, comme l'epoxomycine (Kim *et al.*, 1999) ont été utilisés pour caractériser l'activité protéolytique du protéasome 20S. Dans notre étude, nous avons choisi de comparer l'effet de ces trois inhibiteurs sur la dégradation de CFTR-F508del exprimée stablement dans les cellules BHK-21.

L'utilisation individuelle de ces inhibiteurs a permis de ralentir la dégradation de CFTR-F508del ($T_{1/2}$ ~90min) par rapport à la CHX seule ($T_{1/2}$ ~30min) (**Figure R4 A, B**). Ces résultats confirment ce qui a été observé précédemment (Kopito, 1999 ; Ward *et al.*, 1995) et montrent que malgré un effet comparable, ces inhibiteurs ne sont pas capables d'inhiber complètement la dégradation de CFTR-F508del au cours du temps. En effet, leur effet n'est pas pérennisé au delà de 6h de traitement (**Figure R4 A, B**).

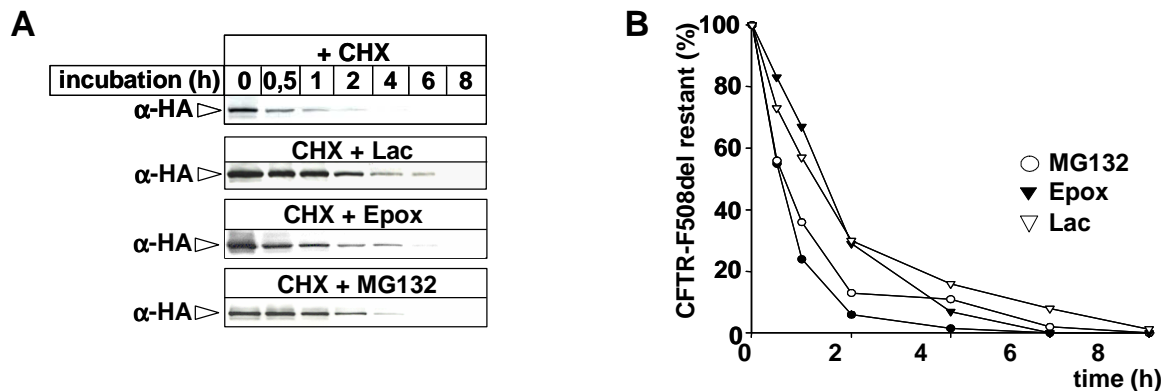


Figure R4: Détermination de la demi-vie de CFTR-F508del en présence des inhibiteurs du protéasome.

A: La disparition de la protéine CFTR-F508del a été suivie en présence de 100µg/mL de CHX et en présence ou en absence de différents inhibiteurs du protéasome (lactacystine, Lac 10µM ; epoxomycine, Epox 1µM ; MG132 10µM). La même quantité de protéine (70 µg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature.

B: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne ± S.E. (n = 5).

☞ Corrélation entre l'activité du protéasome et la dégradation de CFTR-F508del

L'absence d'effet prolongé de ces inhibiteurs sur la dégradation de CFTR-F508del peut s'expliquer soit par un effet partiel sur l'activité protéolytique du protéasome (APP), soit par une dégradation ou/et perte d'affinité de ces inhibiteurs pour leur substrat au cours du temps. Pour vérifier ces possibilités, nous avons procédé à la mesure de l'APP en absence et en présence de lactacystine.

Le protéasome 26S est constitué de deux sous-unités : un cœur protéolytique, le protéasome 20S et un complexe régulateur à activité ATPasique appelé complexe 19S. Le protéasome 20S possède au moins cinq activités peptidasiques dont trois sont bien caractérisées. Elles sont portées par les sous-unités β appelées β₅/X (chymotrypsin-like, Ch-L), β₁/Y (Peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing, PGPH) et β₂/Z (trypsin-like, T-L), qui utilisent le groupement hydroxyle de leur résidu thréonine amino-terminal comme nucléophile pour attaquer les liaisons peptidique (Dick *et al.*, 1998 ; Jäger *et al.*, 1999).

Pour mesurer l'APP dans les extraits cellulaires préparés à partir des cellules BHK-21 exprimant de façon stable la protéine CFTR-F508del, nous avons utilisé des substrats fluorogéniques composés d'un peptide synthétique lié à un fluorochrome, l'AMC (7-Amido-4-MethylCoumarin) (**Tableau RI**). L'AMC ainsi libéré après une activité protéolytique spécifique clivant le peptide après le dernier acide aminé, fluoresce.

Tableau RI: Substrats caractéristiques de trois activités principales du protéasome 20S.

Peptides synthétiques	activités
N-cbz-GGR-AMC	Trypsin-like (T-L)
Suc-LLVY-AMC	Chymotrypsin-like (Ch-L)
Cbz-LLE-AMC	PGPH

Les trois activités T-L, Ch-L et PGPH sont inhibées par la lactacystine (**Figure R5 A**) au cours du temps. En effet, nos résultats montrent, qu'après 6h de traitement, la lactacystine réduit significativement l'APP (~75%) par rapport au contrôle (100%). Cette inhibition est légèrement plus importante après 8h de traitement. La présence prolongée de la lactacystine (16h) n'augmente pas le pourcentage d'inhibition (**Figure R5 A**). Ces résultats montrent que la lactacystine n'inhibe que partiellement l'APP dans les cellules BHK-21. Cet effet n'est pas le résultat d'une dégradation, d'une perte d'affinité ou de la réversibilité de l'effet de la lactacystine. En effet, les résultats indiqués dans la **figure R5 B** montrent qu'un traitement de 6h avec cet inhibiteur suivi de différentes périodes de chasse pendant lesquelles les cellules sont cultivées en son absence, ne modifie pas le pourcentage d'inhibition obtenu après 6h de traitement. Ces observations confirment l'irréversibilité de l'effet de la lactacystine et montrent d'une part qu'elle n'est pas dégradée au cours du temps et d'autre part qu'elle ne perd pas son affinité pour le substrat.

La lactacystine, une fois dans la cellule, est transformée en clasto-Lactacystine β -lactone (β Lac) qui est l'inhibiteur spécifique de l'activité du protéasome 20S. Afin de s'assurer que l'activité résiduelle lactacystine-indépendante (ARLI) n'est pas le résultat d'une absence ou d'une transformation incorrecte de la lactacystine, nous avons refait les mêmes expériences, en présence de clasto-Lactacystine β -lactone. Nous avons obtenu des résultats similaires à ceux obtenus avec la lactacystine. Ces résultats montrent qu'en présence de lactacystine ou de clasto-Lactacystine β -lactone, nous n'arrivons pas à inhiber complètement le protéasome. Pour vérifier que dans notre système d'expression, les substrats sont

spécifiques, nous avons utilisé le SDS (1%) pour inhiber le protéasome. Les résultats confirment que le SDS (1%) inhibe l'APP d'~ 80%.

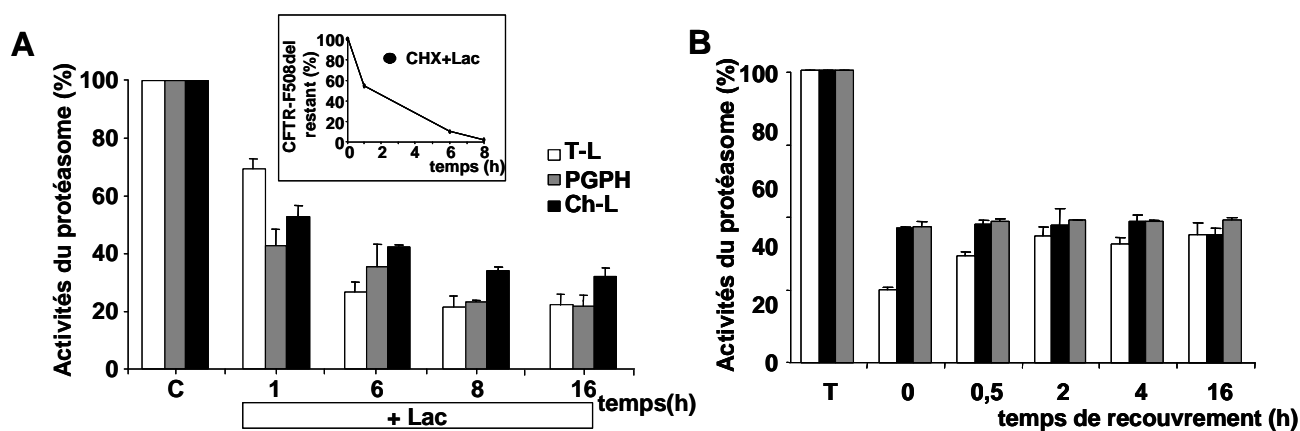


Figure R5: Activités du protéasome dans les lysats cellulaires des BHK-21.

Les substrats (0,1mM) utilisés pour mesurer les trois activités caractéristiques du protéasome sont : GGR pour la trypsin-like (T-L) ; LLVY pour la chymotrypsin-like (Ch-L) ; LLE pour la PGPH. Les activités ont été mesurées en fluorimétrie ($\lambda_{ex} = 395\text{nm}$; $\lambda_{em} = 440\text{nm}$) à TA en présence et en absence de la lactacystine (Lac, 10 μM). Ces activités sont représentées en % par rapport à l'activité déterminée dans les cellules intactes.

A: Mesure des activités du protéasome au cours du temps.

B: Mesure du recouvrement des activités du protéasome après 6h d'inhibition (t=0) par la lactacystine à différents temps.

Fenêtre: Quantité de CFTR-F508del restante, indiquée en % par rapport à la quantité de CFTR-F508del à t=0, mesurée à différent temps en présence de CHX (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et de lactacystine (10 μM).

Par ailleurs, nous avons essayé de corréler cette activité protéolytique avec la vitesse de disparition de CFTR-F508del en présence de lactacystine. Les résultats indiqués sur la **figure R5 A (fenêtre)**, montrent qu'après 8h de traitement en présence de lactacystine et de CHX, uniquement ~1% de CFTR-F508del subsiste, alors que l'activité protéolytique mesurée dans les mêmes conditions est d'~ 20%.

Pour expliquer cette observation, plusieurs hypothèses ont été émises :

- ① L'ARLI observée serait responsable de la disparition totale de CFTR-F508del.
- ② Cette activité pourrait correspondre à un protéasome-like utilisant les mêmes substrats (GGR, LLVY et LLE) que le protéasome 20S.
- ③ L'existence d'une autre voie de dégradation agissant en parallèle de la voie protéasomale.
- ④ La participation de l'activité lysosomale dans l'élimination de CFTR-F508del.

Nous avons, par la suite, tenté de trouver une réponse à ces hypothèses.

3- Effet des inhibiteurs des lysosomes sur la dégradation de CFTR-F508del

Alors que les premières études sur la dégradation de CFTR-F508del ont, clairement, écarté la participation des lysosomes dans cette élimination (Lukacs *et al.*, 1994 ; Cheng *et al.*, 1995), des travaux plus récents, montrant un possible trafic intracellulaire de CFTR-F508del, suggèrent l'implication de la voie lysosomale dans l'élimination rapide de cette protéine (Bannykh *et al.*, 2000 ; Kamhi-Nesher *et al.*, 2001, Yoo *et al.*, 2002 ; Fu et Sztul, 2003). Pour vérifier ces possibilités, nous avons effectué des expériences de stabilité de CFTR-F508del en présence d'inhibiteurs de la voie lysosomale.

Pour cela, nous avons utilisé le chlorure d'ammonium (NH₄Cl, 15mM) (Amenta et Brocher, 1980) et la chloroquine (chl, 200μM) (Poole *et al.*, 1977), deux bases lysosomotropiques qui vont perturber le gradient de pH entre le cytoplasme et les lysosomes. Nous avons également utilisé la bafilomycine B (BafB, 1μM), inhibiteur spécifique de la pompe H⁺-ATPase, génératrice du gradient de proton nécessaire au maintien du pH acide dans les lysosomes (Papini *et al.*, 1993), le pH acide étant nécessaire à la fonction des hydrolases lysosomales.

L'ensemble de nos résultats montre que l'inhibition de l'activité protéolytique liée aux lysosomes n'est pas impliquée dans la dégradation de CFTR-F508del. En effet, en présence des trois inhibiteurs, la T_{1/2} (~30min) n'est pas modifiée par rapport au contrôle (+CHX) (Figure R6 A, B).

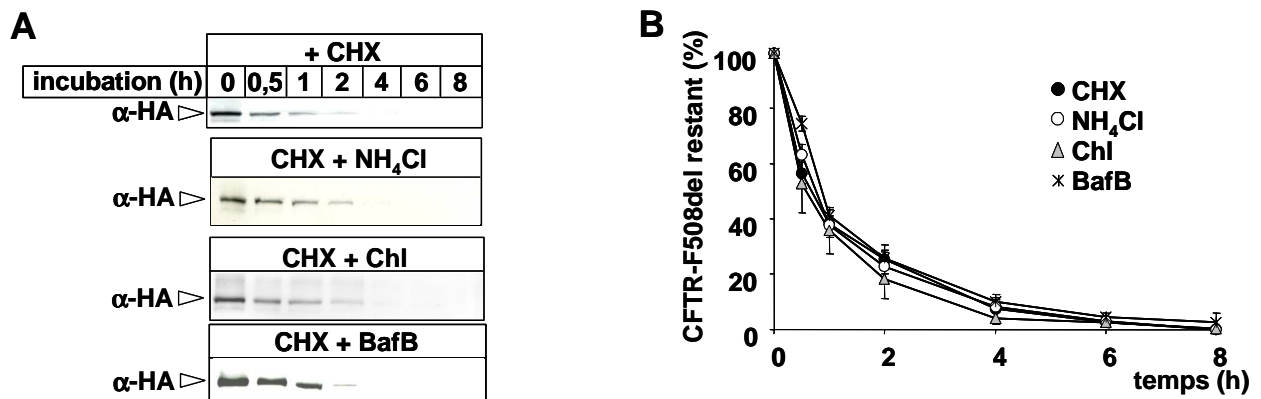


Figure R6: Détermination de la demi-vie de CFTR-F508del en présence d'inhibiteurs des lysosomes.

A: La disparition de CFTR-F508del a été suivie en présence de CHX (100μg/mL) seule ou en présence de NH₄Cl (15mM), de Chloroquine (chl, 200μM) ou de Bafilomycine B (BafB, 1μM), inhibiteurs de l'activité lysosomale. La même quantité de protéine (70 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature.

B: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne ± S.E (n=4).

4- Rôle de l'ATP dans la dégradation de CFTR-F508del

Il ressort de nos résultats indiqués ci-dessus, que l'ARLI pourrait être le résultat de la participation d'un protéasome-like utilisant les mêmes substrats que le protéasome 20S. Pour vérifier cette hypothèse, en absence d'inhibiteurs capables de discriminer entre ces deux possibilités, nous avons choisi de priver le protéasome et le potentiel protéasome-like de leur source d'énergie, l'ATP. En effet l'ATP, en plus de son rôle principal dans l'activité protéolytique du 20S, est aussi impliqué dans l'assemblage des différentes sous-unités du protéasome 26S (Orino *et al.*, 1991). Nous pourrions donc légitimement penser qu'il l'est aussi dans l'activité du protéasome-like. L'ensemble de ces raisons nous a conduit à effectuer des expériences de déplétion en ATP et à étudier l'activité du protéasome et surtout la dégradation de CFTR-F508del.

☞ Caractérisation de la déplétion en ATP au niveau cellulaire

Dans un premier temps, nous avons procédé à la caractérisation de la déplétion cellulaire en ATP dans notre système d'expression hétérologue BHK-21. Ainsi, nous avons observé que l'utilisation d'un milieu spécifique de déplétion en ATP (absence de pyruvate, présence de 2-desoxy-D-glucose (5mM) et d'antimycine A (0,4µg/mL)) nous permet de réduire rapidement (dès 5min) le contenu intracellulaire en ATP (~95%) (**Figure R7 A**). Cette diminution se poursuit dans le temps et, à 90min, il ne reste que 1% de l'ATP initial. Au-delà, nous avons une mortalité cellulaire plus importante (~30%) observée par coloration au bleu trypan (**Figure R7 A**). Par ailleurs, nous avons aussi observé, dans ces conditions, l'apparition de cellules nécrosées (**Figure R7 B**). Pour ne pas travailler dans des conditions où la mortalité cellulaire est élevée, nous avons limité le temps de déplétion à 90min.

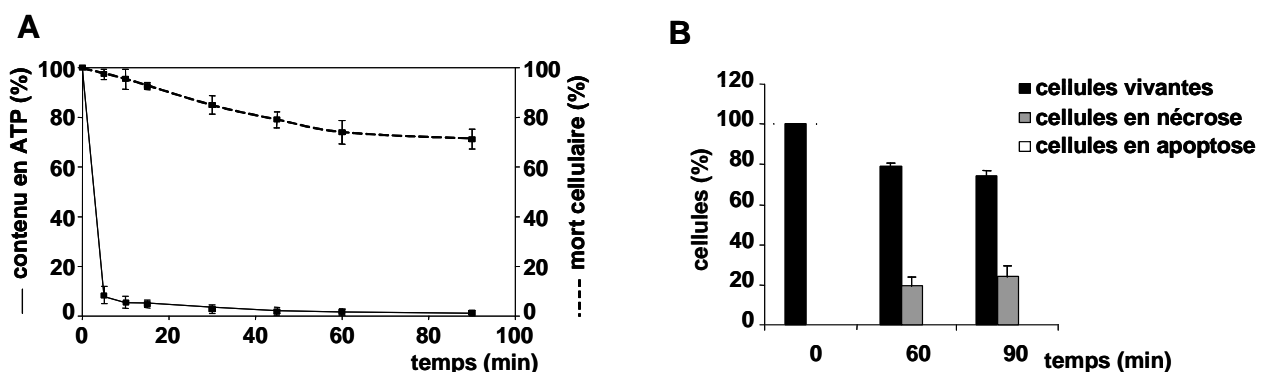


Figure R7: Caractérisation de la déplétion en ATP.

A: Détermination du contenu en ATP (ligne continue) et de la viabilité cellulaire (ligne discontinue) pendant la déplétion en ATP dans les cellules BHK-CFTR-F508del. Le contenu en ATP a été mesuré avec le kit luciférase et la viabilité cellulaire a été évaluée par coloration au bleu trypan.

B: Détermination du pourcentage de cellules nécrosées (coloration par l'iodure de propidium) et apoptotiques (fragmentation des noyaux observée par coloration au Hoeschst) au cours de la déplétion en ATP.

☞ Effet de la déplétion en ATP sur l'activité du protéasome

En utilisant les conditions de déplétion en ATP indiquées ci-dessus, nous avons mesuré l'APP. Les résultats indiqués sur la figure R8 montrent qu'après 90min de déplétion, l'APP est fortement inhibée. Cependant, malgré une déplétion en ATP de 95% à 5min, l'APP n'a été réduite que d'~ 20% (Figure R8). Plus frappant, alors qu'à 90min de déplétion le contenu en ATP est pratiquement égale à zéro, l'APP se maintient à ~ 15%.

Ces résultats montrent clairement que l'ATP est important pour l'activité protéolytique du protéasome et intervient probablement dans l'assemblage de ses sous-unités. Cependant, nous observons aussi une activité protéolytique résiduelle dont le niveau est à peu près comparable à celui de l'ARLI. Ceci suggère que la dégradation continue de CFTR-F508del est médiée par une voie qui est lactacystine-indépendante et ATP-indépendante.

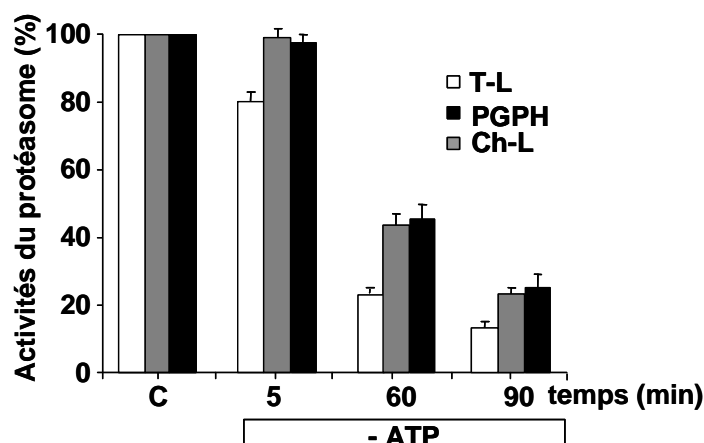


Figure R8: Mesure de l'activité du protéasome au cours de la déplétion en ATP.

Les substrats (0,1mM) utilisés pour mesurer les trois activités caractéristiques du protéasome sont : GGR pour la trypsin-like (T-L) ; LLVY pour la chymotrypsin-like (Ch-L) ; LLE pour la PGPH. Les activités ont été mesurées en fluorimétrie ($\lambda_{ex} = 395\text{nm}$; $\lambda_{em} = 440\text{nm}$) à TA en déplétion ou non d'ATP. Ces activités sont représentées en % par rapport à l'activité déterminée dans les cellules non déplétées en ATP.

☞ Effet de la déplétion en ATP sur la stabilité de CFTR-F508del

Si le protéasome ou une activité protéasome-like est responsable de la dégradation continue de CFTR-F508del, alors une déplétion cellulaire en ATP aurait pour conséquence de stabiliser la protéine mutée et d'augmenter sa $T_{1/2}$. Il est bien connu que l'ATP joue un rôle très important dans le processus de repliement de CFTR-F508del (Lukacs *et al.*, 1994, Du *et al.*, 2005). Pour mieux s'affranchir de cet effet, nous avons inhibé la synthèse des protéines

par la CHX. Nous avons ainsi suivi une population de CFTR nouvellement synthétisée et définitivement repliée.

Nous avons suivie l'expression de CFTR-F508del en présence de CHX seule ou associée à la déplétion en ATP. La figure R9 A, B montre que la dégradation de CFTR-F508del est deux fois plus rapide ($T_{1/2} \sim 15$ min) comparé au contrôle (+CHX, $T_{1/2} \sim 30$ min). Nous avons vérifié que cet effet n'est le résultat ni d'une différence de concentration de protéines grâce à la sous unité α de la Na^+/K^+ -ATPase (Figure R9 A), ni la conséquence d'une agrégation de CFTR-F508del. En effet la déplétion en ATP n'augmente pas l'apparition de CFTR-F508del dans la fraction insoluble par rapport à la fraction soluble (Figure R9 C).

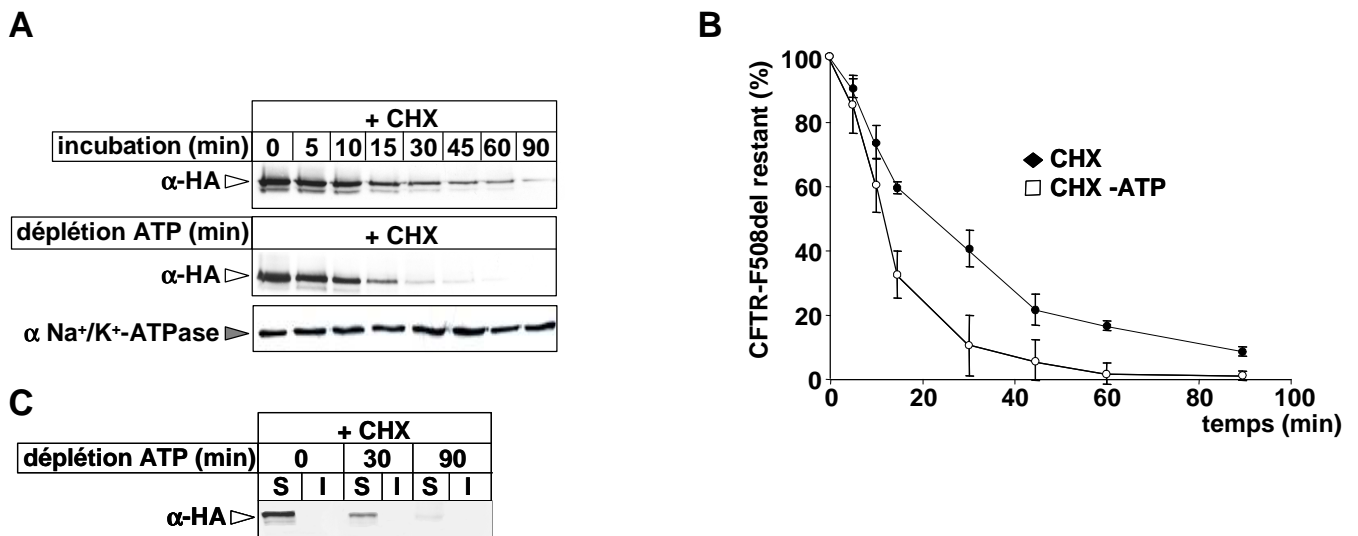


Figure R: Effet de la déplétion en ATP sur la demi-vie de CFTR-F508del.

Le protocole de déplétion en ATP a été décrit dans **Matériels et Méthodes**.

A: La disparition de CFTR-F508del a été suivie en présence de CHX (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) associée ou non à une déplétion en ATP. La même quantité de protéine (70 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature. L'anti- Na^+/K^+ -ATPase détecte la sous-unité alpha.

B: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à $t=0$ en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne \pm S.E. ($n = 5$).

L'ensemble des résultats obtenu jusqu'à ce point montre que le protéasome participe, mais de manière limitée, à la dégradation de CFTR-F508del et suggère le rôle d'autre(s) voie(s) de dégradation. Ils montrent également que ces voies sont lactacystine- et ATP-indépendantes.

II/ La protéine CFTR-F508del dans le RE

CFTR-F508del est localisée dans le RE, tout au moins dans notre système d'expression hétérologue, les cellules BHK-21. Ceci implique que la machinerie de dégradation, surtout celle qui est lactacystine- et ATP-indépendante, pourrait être localisée soit dans le compartiment où CFTR-F508del réside, soit dans le cytoplasme, nécessitant donc la retranslocation de CFTR-F508del, soit dans un autre compartiment cellulaire.

Pour discriminer entre ces possibilités, nous avons choisi, dans un premier temps, d'étudier la dégradation de CFTR-F508del directement dans son compartiment de rétention, le RE. Pour obtenir ce compartiment, nous avons utilisé deux techniques différentes : la centrifugation différentielle et le fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose.

La différence entre ces deux techniques réside dans la pureté de la fraction réticulaire obtenue. En effet, avec la technique de centrifugation différentielle, la fraction microsomale (FM) obtenue contient en plus du RE, le Golgi, la membrane plasmique et les vésicules intermédiaires (endosomes et vésicules cargo). Par contre, le fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose permet d'obtenir une fraction riche à 90% en RE. L'intérêt d'utiliser ces deux techniques est de pouvoir étudier la dégradation de CFTR-F508del en présence et en absence d'autres compartiments cellulaires. Ceci nous permettra de préciser si la dégradation est strictement réticulaire ou si elle a lieu aussi dans des compartiments autres que le RE. En effet, récemment, il a été proposé que CFTR-F508del serait transportée dans un autre compartiment intermédiaire avant d'être dégradée (Fu et Sztul, 2003). Un autre avantage de ces techniques est de pouvoir vérifier si cette dégradation a lieu dans le cytoplasme et si elle est influencée par les protéines cytoplasmiques.

A. Fraction microsomale (FM) obtenue par centrifugation différentielle.

Cette fraction a été obtenue à partir de cellules BHK-21 transfectées de manière stable par la protéine CFTR-F508del en utilisant différentes vitesses de centrifugation. Cette technique nous a permis de sédimenter les différentes fractions en fonction de leur densité (**Figure R10**).

Avant de l'utiliser pour étudier la dégradation de CFTR-F508del, la FM riche en RE a été caractérisée.

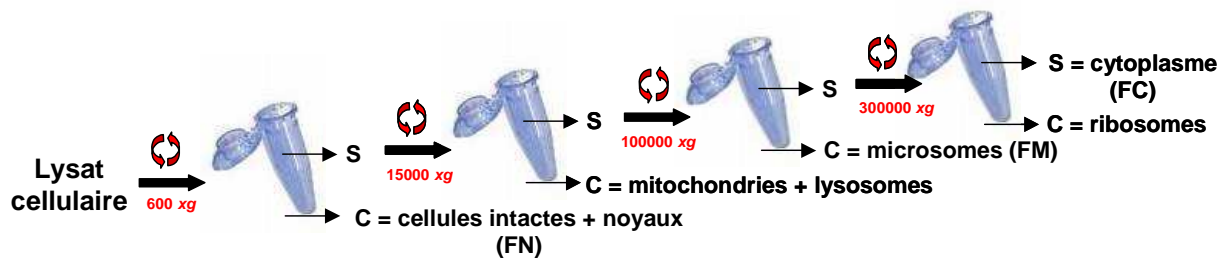


Figure R10: Principe de la centrifugation différentielle.

1- Caractérisation de la FM

∞ Taux en ATP

D'une façon générale, l'ATP est une molécule cytoplasmique libre. Dans le cas contraire, ce nucléotide se trouve associé aux protéines cibles, ce qui pourrait être le cas dans notre FM. Pour vérifier cela, nous avons déterminé, à l'aide du kit luciférase (*Sigma*, France), le contenu en ATP de la FM (**Figure R11**). Les résultats obtenus montrent un taux en ATP d'~ 4,6% dans la FM par rapport au contrôle (cellules intactes). Ce très faible taux peut s'expliquer par de l'ATP présent dans la lumière des différents compartiments constituant la FM.

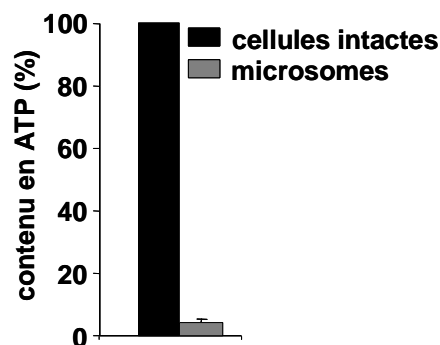


Figure R11: Détermination du taux d'ATP.

Le contenu en ATP (indiqué en %) dans les cellules intactes et dans la FM a été mesuré à l'aide du kit luciférase.

∞ Activités protéasomales et détection de la sous-unité $\alpha 3$ du protéasome 20S

D'une manière générale, le protéasome présente une localisation soit nucléaire soit cytoplasmique (Wojcik et DeMartino, 2003), alors que CFTR-F508del est plutôt réticulaire. Comme nous avons montré que le protéasome et une autre voie protéolytique lactacystine- et ATP-indépendante, utilisant les mêmes substrats, participent à la dégradation de CFTR-F508del, nous avons essayé, en mesurant l'activité du protéasome dans la FM, de corrélérer ces différentes observations.

Pour cela, nous avons incubé la FM en présence des différents substrats caractéristiques (GGR, LLVY et LLE) des trois activités principales du protéasome (T-L, Ch-L et PGPH). Pour pouvoir comparer cette activité à celle mesurée dans les cellules intactes et dans les différentes fractions obtenues après centrifugation (noyaux : FN, cytosol : FC et microsomes : FM), nous avons exprimé l'activité du protéasome en fonction de la quantité de protéines (μg) (**Figure R12 A**). Comme prévu, la majorité de l'activité a été observée dans les cellules intactes et les FN et FC. Par contre, à notre grande surprise, nous avons détecté une faible activité dans la FM, par rapport à celle mesurée dans la FN et dans la FC où le protéasome est localisé (Wojcik et DeMartino, 2003).

Afin de vérifier que cette activité est bien associée au protéasome, nous l'avons mesurée en présence de clasto-Lactacystine β -lactone (βLac , forme active de la lactacystine). Les résultats obtenus montrent une inhibition d' $\sim 65\%$ dans la FN et la FC, alors qu'elle n'est que d' $\sim 45\%$ dans la FM (**Figure R12 A**). Ces résultats montrent, encore une fois, que, malgré sa spécificité et son irréversibilité, la clasto-Lactacystine β -lactone est incapable d'inhiber complètement l'activité du protéasome. Ces observations confirment les résultats obtenus sur les extraits cellulaires et appuient l'hypothèse de l'existence d'une voie protéolytique lactacystine-indépendante utilisant les mêmes substrats conventionnels que le protéasome. Au regard de la concentration très faible d'ATP trouvée dans la FM, cette activité est aussi ATP-indépendante.

Cependant, ces résultats ne permettent pas de conclure sur la localisation de ces deux types d'activité au niveau de la FM. En effet, le protéasome et l'activité ATP- et lactacystine-indépendante peuvent être, soit localisés à la périphérie des membranes, directement ou par le biais d'autres protéines pouvant être transmembranaires, soit intégrés à la membrane. Pour répondre à cette question, nous avons traité la FM avec du carbonate du sodium (Na_2CO_3) à pH 11,5, agent chaotropique capable de perturber les différentes liaisons autre que la liaison covalente, intervenant dans les interactions protéine-protéine et dans les interactions membrane-protéine (Fujiki *et al.*, 1982). Par rapport à la FM intacte, le traitement par le Na_2CO_3 inhibe $\sim 30\%$ de l'activité du protéasome. Cette inhibition résulterait d'une perte de protéines périphériques associées à l'activité du protéasome. Cependant, de façon inattendue, nous avons observé que l'activité associée à la FM est inhibée à plus de 70% en présence de clasto-Lactacystine β -lactone. Ces résultats montrent que le traitement par le Na_2CO_3 augmente la sensibilité à la clasto-Lactacystine β -lactone (**Figure R12 B**).

Sachant que le tampon de mesure ne contient pas d'ATP, cette activité résiduelle soulève la question de la spécificité, d'une part de la clasto-Lactacystine β -lactone, et d'autre

part des substrats peptidiques vis à vis des activités protéolytiques du protéasome. L'ensemble de ces résultats montre la présence d'une activité protéasome-like qui serait ATP- et lactacystine-indépendante.

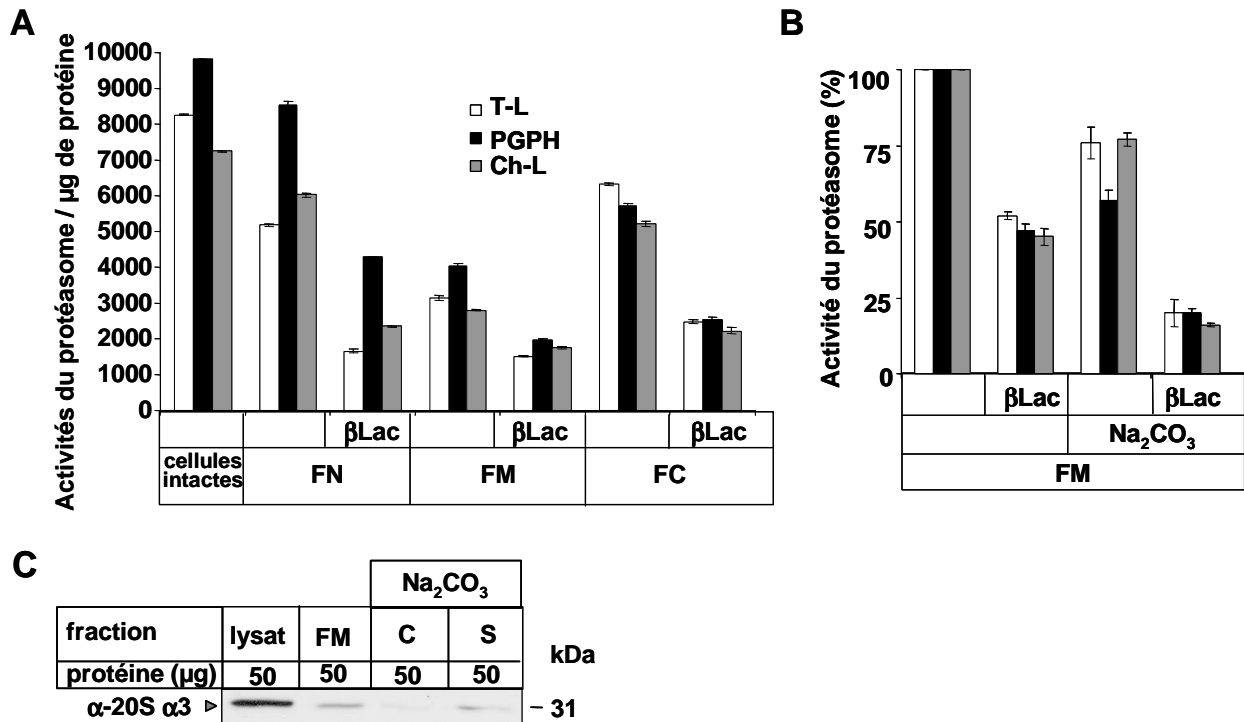


Figure R12: Mesure de l'activité du protéasome.

Les substrats (0,1mM) utilisés pour mesurer les trois activités caractéristiques du protéasome sont : GGR pour la trypsin-like (T-L) ; LLVY pour la chymotrypsin-like (Ch-L) ; LLE pour la PGPH. Les activités ont été mesurées en fluorimétrie ($\lambda_{ex} = 395nm$; $\lambda_{em} = 440nm$) à TA en présence et en absence de la clasto-Lactacystine β -lactone (β Lac, $10\mu M$). Ces activités sont représentées en % par rapport à l'activité déterminée dans les cellules intactes.

A: Mesure des activités du protéasome dans les différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle.

B: Mesure des activités du protéasome dans la FM après traitement β Lac par l'agent chaotrope, Na_2CO_3 .

C: Détection de la sous-unité $\alpha 3$ dans la FM intacte ou après traitement par le Na_2CO_3 et séparation du culot (C) et du surnageant (S). Les protéines de la FM ont été séparées sur un gel de 12%, électrotransférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par immunodétection, en utilisant l'anticorps anti-20S $\alpha 3$ et le kit ECL.

Une autre question, restée en suspend, était la nature des protéines associées à l'activité protéasomale lactacystine-dépendante qui était par ailleurs ATP-indépendante. Pour répondre à cette question, nous avons cherché la présence de la sous-unité $\alpha 3$ du complexe protéolytique 20S, dans la FM, par immunodétection. Les résultats montrent la présence, dans la FM, de cette sous-unité qui disparaît après traitement par le Na_2CO_3 (**Figure R12 C**). Cette protéine se retrouve par la suite dans le surnageant montrant qu'elle est associée aux microsomes (**Figure R12 C**).

∞ Expression des protéines chaperonnes

La dégradation des protéines incorrectement repliées et/ou incorrectement assemblées au niveau du RE nécessite la participation d'un grand nombre de protéines chaperonnes qui sont impliquées, soient dans la reconnaissance, soient dans la dégradation, soient dans les deux (Ellgaard et Helenius, 2003). Les plus étudiées sont la calnexine (CNX), BiP/Grp78, Hsp70, Hsp90 et l'ubiquitine (Ellgaard et Helenius, 2003).

Du fait de la présence d'une activité protéolytique associée au protéasome et confirmée par la détection de la sous-unité $\alpha 3$, nous avons recherché la présence de ces protéines chaperonnes dans la FM. L'utilisation d'anticorps dirigés contre ces dernières nous a permis de détecter leur présence dans la FM (**Figure R13**). Du fait de leur localisation cytoplasmique, les protéines Hsp70 et Hsp 90 ont été faiblement détectées dans la FM. Par contre les protéines réticulaires, BiP et CNX, sont exprimées au même niveau que dans le lysat cellulaire (**Figure R13**). La localisation périphérique ou intra-membranaire de ces protéines a été déterminée après traitement des microsomes par le Na_2CO_3 qui permet de séparer les protéines périphériques (S) des microsomes (C). Le traitement par le Na_2CO_3 confirme les résultats précédents et montre, en plus, que la protéine Hsp90 reste associée aux microsomes au même titre que la protéine BiP (**Figure R13**). Par ailleurs, nous avons aussi montré la présence de protéines ubiquitinylées dans la FM dont l'intensité diminue après traitement au Na_2CO_3 (**Figure R13**).

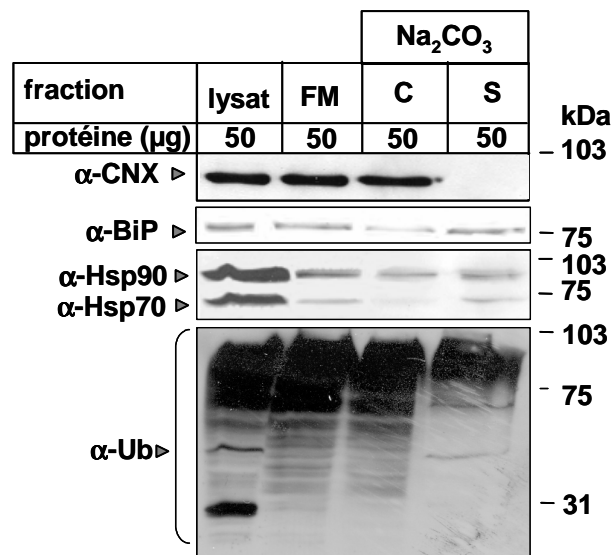


Figure R13: Expression des protéines chaperonnes dans la FM.

La détection des différentes protéines chaperonnes dans la FM intacte ou après traitement par Na_2CO_3 et séparation du culot (C) et du surnageant (S), a été réalisée par immunodétection. La même quantité de protéine (50 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 12%, électrotransférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par l'utilisation d'anticorps anti-CNXX, anti-BiP, anti-Hsp70, anti-Hsp90 et anti-ubiquitine (Ub) et le kit ECL.

L'ensemble de ces résultats confirme la présence d'une activité protéolytique ATP-indépendante et lactacystine-dépendante et -indépendante dans la FM. Cette activité est associée à la présence de l'ensemble des ingrédients nécessaires à l'élimination des protéines incorrectement repliées et/ou incorrectement assemblées.

De plus, ces résultats rendent légitime l'utilisation de la FM comme matériel pour étudier la dégradation de CFTR-F508del tout en s'affranchissant des protéines cytoplasmiques. Pour cela nous avons d'abord procédé à la caractérisation de l'expression de CFTR-F508del dans cette fraction.

2- Caractérisation de l'expression de CFTR-F508del dans la FM

CFTR-F508del est une protéine transmembranaire qui présente une orientation bien particulière par rapport à la membrane des microsomes. Pour confirmer cela dans notre préparation microsomale, nous avons immunodéecté la protéine CFTR-F508del, soit après traitement par le Na₂CO₃, soit après digestion enzymatique par la trypsine, en absence ou en présence de Triton X-100 (détergent non ionique solubilisant de façon douce la membrane lipidique). Les résultats obtenus (**Figure R14 A, B**) montrent que la protéine CFTR-F508del est bien présente dans la FM. Elle est complètement intégrée dans la bicouche lipidique comme le confirme sa présence dans le culot après traitement par le Na₂CO₃ (**Figure R14 A**). Dans la FM, le profil de digestion à la trypsine des microsomes intacts, en absence ou en présence de Triton X-100 (**Figure R14 B**), montre que CFTR-F508del présente une orientation normale avec son large domaine cytoplasmique accessible à la trypsine. Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par Zhang et Du (Zhang *et al.*, 1998 ; Du *et al.*, 2005). La CNX, protéine transmembranaire avec une large partie luminale, a été utilisée comme contrôle. La trypsinolyse détruit les déterminants antigéniques seulement lorsque les microsomes sont perméabilisés avec le Triton X-100 (**Figure R14 B**), suggérant que les microsomes obtenus par centrifugation différentielle sont des vésicules correctement refermées, avec un compartiment luminal inaccessible aux protéases.

Enfin, le niveau de glycosylation de CFTR-F508del dans la FM a été analysé par digestions glycosydiques (**Figure R14 C**). Pour cela nous avons utilisé l'endo H et PNGase F. Après digestion, nous observons une diminution du poids moléculaire de CFTR-F508del correspondant à la déglycosylation de la forme immature bloquée dans le RE, comparable à ce que nous avons précédemment obtenu dans le lysat cellulaire.

Ainsi, la protéine CFTR-F508del, observée dans la FM, garde l'ensemble de ses caractéristiques biochimiques à savoir l'intégration, l'orientation et la glycosylation.

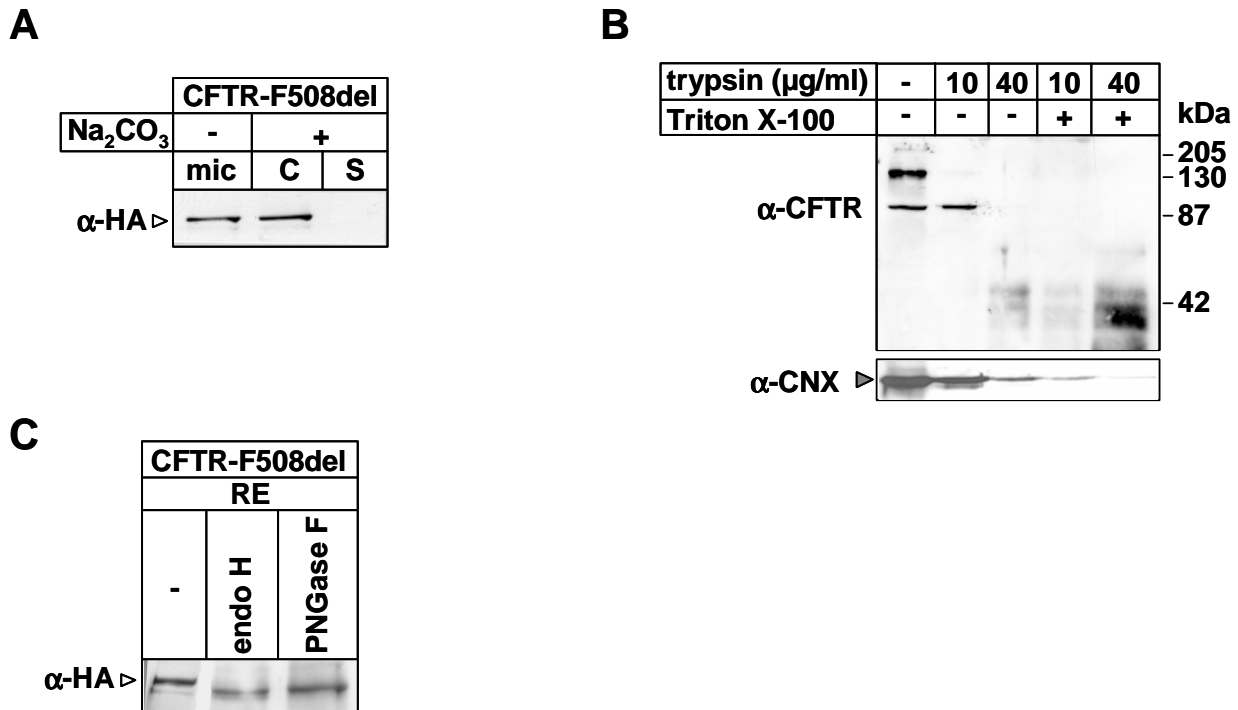


Figure R14: Caractérisation de l'expression de CFTR-F508del dans la FM.

La même quantité de protéine (50 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%-12%, électrotransférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par l'utilisation d'anticorps anti-CFTR (L12B4) et le kit ECL.

A, B: Expression et orientation de CFTR-F508del dans la FM intacte ou après traitement par le Na₂CO₃ et séparation du culot (C) et du surnageant (S) (**A**), ou après digestion à la trypsine en absence ou en présence de Triton X-100 (**B**). L'anticorps anti-CN X détecte la calnexine à 95 kDa.

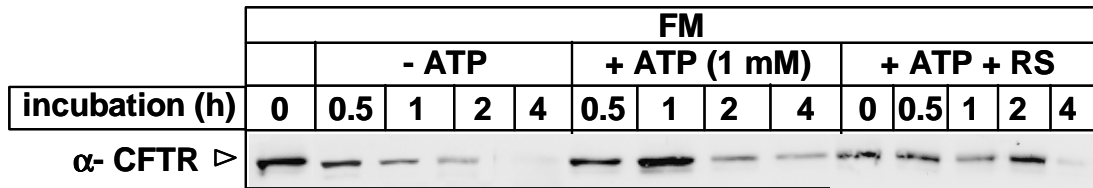
C: Profil de glycosylation de la protéine CFTR-F508del. Les extraits protéiques préparés à partir de la FM ont été traités soit par l'endo H soit par la PNGase F.

3- Dégradation de CFTR-F508del

Pour étudier la dégradation de CFTR-F508del dans la FM, nous avons mis au point un test de dégradation basé sur la quantification, par immunodétection, de la protéine CFTR restante, après incubation de la FM à 37°C dans un tampon approprié (**voir Matériels et Méthodes**). Par ailleurs, les mesures de l'activité protéolytique dans la FM ont révélé la présence d'une voie ATP-indépendante, ce qui nous a poussé à définir le rôle de l'ATP dans la dégradation de CFTR-F508del. Les résultats obtenus montrent clairement que, dans la FM, en absence d'ATP, CFTR-F508del est dégradée rapidement avec une T_{1/2} d'~30min (**Figure R15 A, B**). Cependant à notre grande surprise, l'ajout de 1mM d'ATP ralentit cette dégradation (T_{1/2} ~ 60min). Etant donné que la molécule d'ATP est très instable dans une

solution aqueuse, nous avons mesuré le même phénomène mais, cette fois, en présence d'un système de régénération d'ATP utilisant 1mM d'ATP, 40mM de phosphocréatine et 0,2mg/mL de créatine kinase (**Figure R15 A**). Nous avons observé une $T_{1/2}$ légèrement supérieure (~ 90min) confirmant que l'ATP est dégradé dans une solution aqueuse et montrant, pour la première fois, son rôle dans la stabilisation de CFTR-F508del. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés à l'échelle cellulaire (**Figure R15**).

A



B

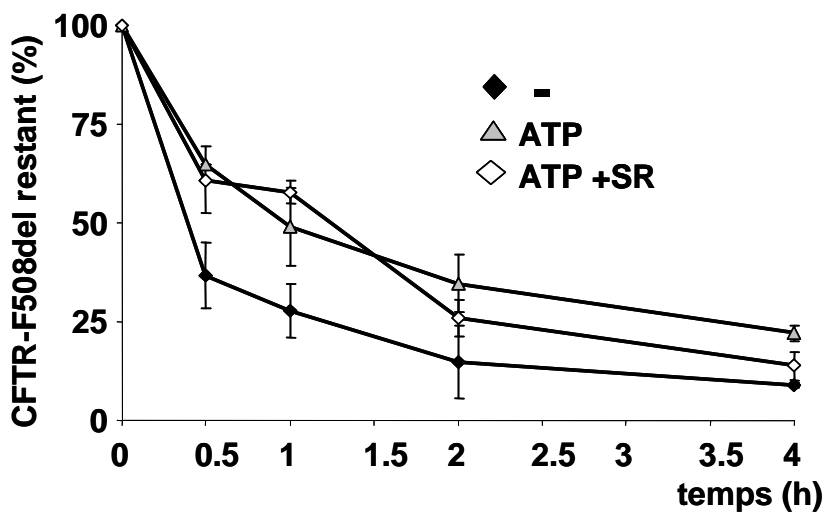


Figure R15: Rôle de l'ATP dans la dégradation de CFTR-F508del.

A: La disparition de CFTR-F508del a été suivie en absence d'ATP, ou en présence de 1mM d'ATP seul, ou additionné d'un système assurant sa régénération (ATP + SR). La même quantité de protéine (50 μ g) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anticorps anti-CFTR et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature.

B: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne \pm S.E. ($n = 3$).

4- Profil d'inhibition de la dégradation de CFTR-F508del dans la FM

Pour mieux caractériser cette voie de dégradation qui semble être ATP-indépendante, nous avons utilisé une série de molécules pour inhiber différents types de protéases (Rodgers et Dean, 2003 ; Orino *et al.*, 1991 ; Fenteany *et al.*, 1994 ; Lee et Goldberg, 1998, Hoffman et

Rechsteiner, 1996). Le **tableau RII** résume l'origine ainsi que les cibles des différentes molécules.

Tableau RII: Récapitulatif des différents molécules utilisées pour inhiber la dégradation de CFTR-F508del.

Inhibiteurs	Origine	Cibles
clasto-Lactacystine β -lactone	famille des β -lactones, extraite de Streptomyces	Sous-unités catalytiques β du protéasome, cathepsine A
MG132	tripeptide synthétique	Sous-unités catalytiques β du protéasome, cathépsines, calpaïnes
Hémine	Erythrocyte	Activité ATPase du protéasome 19S
DMSO	composé chimique	Chaperonne chimique
EDTA	composé chimique	Metallo-exopeptidase, chelateur des ions divalents nécessaires à l'activité du protéasome 26S
Epoxomycine	Lignée d'actinomycète n°Q996-17	Sous-unités catalytiques β

A 37°C, l'incubation de la FM dans le tampon de dégradation sans ATP, en présence de clasto-Lactacystine β -lactone et du MG132 inhibe ~ 50% de la dégradation de CFTR-F508del, alors que cette inhibition n'est que d'~ 30% dans le cas de l'Hémine, du DMSO et de l'EDTA (**Figure R16 A, C**). Ce profil d'inhibition est caractéristique d'une activité protéasomale qui semble être ATP-indépendante.

L'ensemble de ces expériences a été réalisé à 37°C. Nous pourrions donc légitimement supposer que, à cette température, une autodégradation de CFTR-F508del peut être déclenchée. Pour écarter cette hypothèse, nous avons reconduit les mêmes expériences mais à 26°C, température à laquelle l'ensemble des protéases se trouvent inhibées (Song *et al.*, 2003). Les résultats obtenus (**Figure R16 B**) démontrent clairement l'implication d'une voie de dégradation inhibée à 26°C. En effet, à cette température, nous n'observons ni dégradation ni stabilisation, respectivement en absence et en présence des différents inhibiteurs (**Figure R16 B, C**).

Au vu des différents résultats, nous pouvons suggérer la présence d'une activité protéasome-like, qui, de manière surprenante, est ATP-indépendante, mais présente un profil d'inhibition comparable à celui du protéasome et surtout utilise les mêmes substrats (GGR, LLVY et LLE)

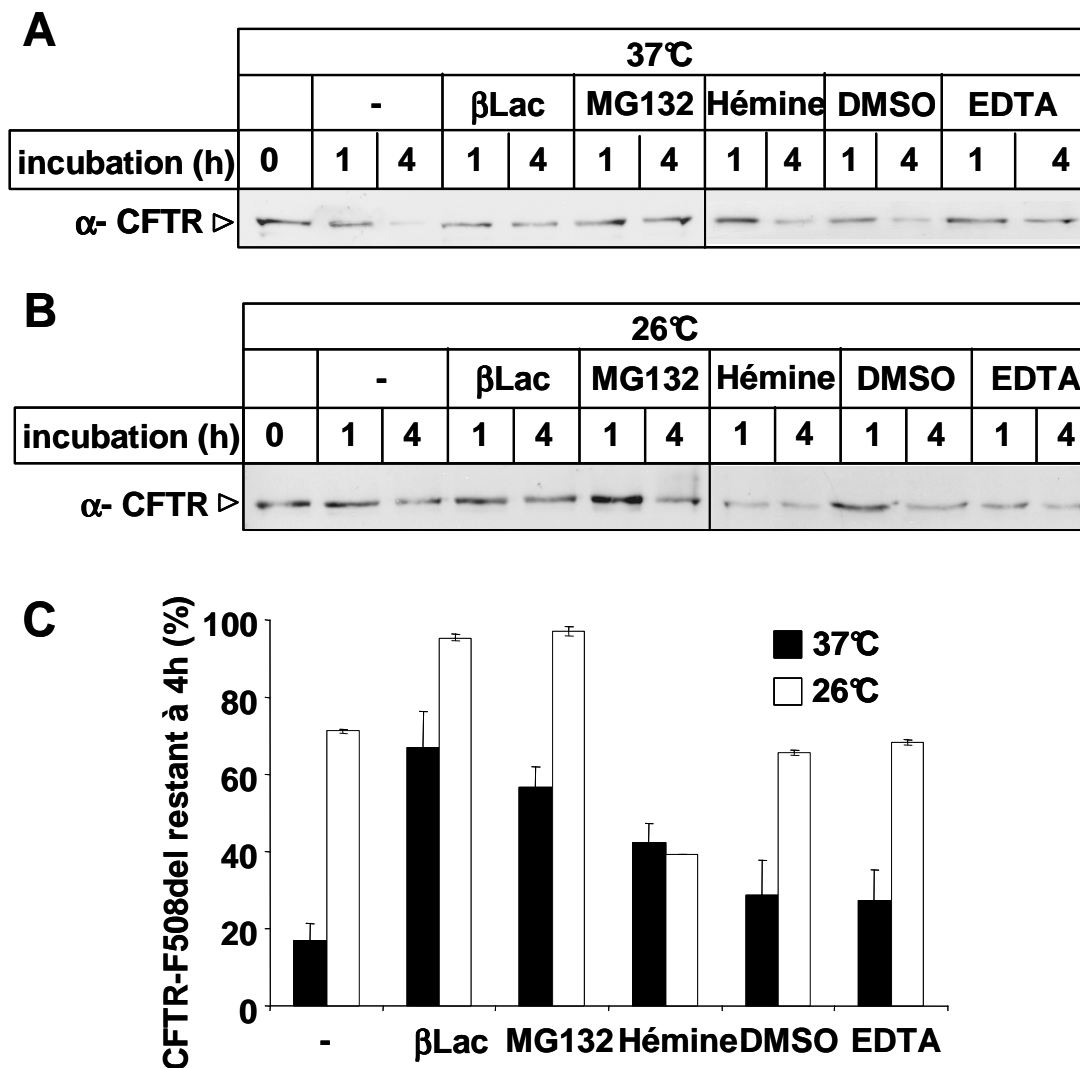


Figure R16: Profil d'inhibition de la dégradation de CFTR-F508del à 37°C et à 26°C.

La FM incubée soit à 37°C soit à 26°C en présence ou en absence de clasto-Lactacystine β-lactone (β lac, 10μM), MG132 (10μM), Hémimine (40μM), DMSO (10%) et EDTA (1mM) au cours du temps.

La même quantité de protéine (50 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-CFTR (L12B4) et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature.

A: Dégradation de CFTR-F508del à 37°C.

B: Dégradation de CFTR-F508del à 26°C.

C: Pourcentage de CFTR-F508del restant après 4 h de traitement à 37°C ou à 26°C par rapport à la valeur initiale de CFTR-F508del à t=0. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne ± S.E. (n = 3).

5- Rôle des facteurs cytosoliques

La FM est un mélange de microsomes provenant de différents compartiments autres que le noyau, les mitochondries et le cytoplasme. Sachant que le protéasome, comme nous l'avons montré auparavant (**Figure R17**), présente une localisation cytoplasmique en plus de sa localisation nucléaire, et que, dans la FM, nous avons observé une activité protéasome-like sensible à la clasto-Lactacystine β-lactone, mais ATP-indépendante, nous avons cherché à

déterminer le rôle du protéasome cytosolique, mais aussi de protéases caractéristiques de ce compartiment (Wolf et Kopan, 2004 ; Schmitz *et al.*, 2004 ; Qui *et al.*, 2004) dans la dégradation de CFTR-F508del.

Pour cela, nous avons incubé la FM en présence de différentes concentrations de cytosol purifié. Après une incubation de 4h à 37°C, nous n'avons pas observé d'effet jusqu'à 40µg de protéine cytosolique (**Figure R17 A**). En présence de 60µg, la protéine CFTR-F508del est en partie dégradée (**Figure R17 A**). Ces résultats suggèrent la participation du protéasome cytoplasmique dans l'élimination de CFTR-F508del. D'autant plus que, dans la FC, nous avons auparavant, d'une part, observé une activité protéasomale inhibée par la clasto-Lactacystine β-lactone (**Figure R17 A**) et, d'autre part, mesuré la concentration en ATP (~ 5pmol/µg de protéines) (**Figure R17 B**). Le rôle d'autres protéases cytoplasmiques n'est pas à exclure.

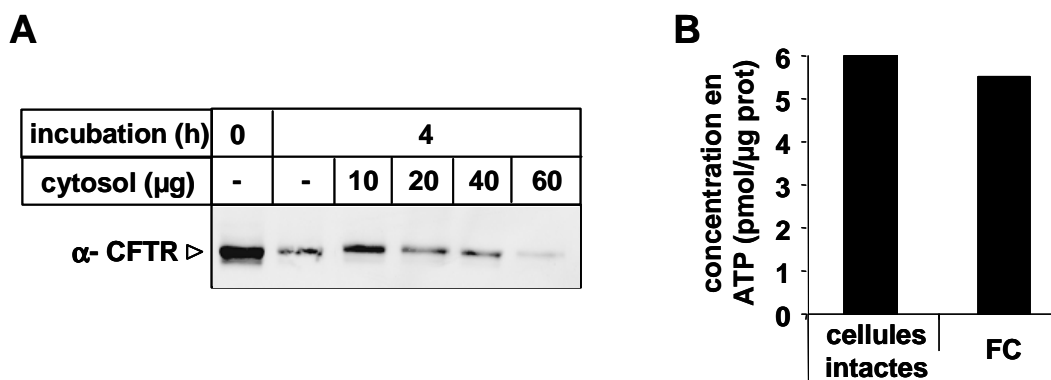


Figure R17: Détermination du rôle des protéases cytosoliques dans la dégradation de CFTR-F508del.

A. La FM est incubée pendant 4h à 37°C en présence ou en absence de différentes concentrations de protéines cytosoliques. La même quantité de protéine (50 µg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-CFTR (L12B4) et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature.

B. Mesure de la concentration d'ATP dans la fraction cytosolique par rapport au lysat cellulaire (cellules intactes). Cette concentration a été déterminée en utilisant le kit luciférase et exprimée en pmol/µg de protéines.

Les résultats obtenus avec les protéines cytosoliques nous ont étonné dans la mesure où tous nos résultats, obtenus jusqu'à ce point, supportent une dégradation locale avec une voie protéolytique associée aux microsomes. Pour mieux comprendre le rôle du protéasome dans l'élimination de CFTR-F508del, nous avons préparé la FM après avoir traité les cellules pendant 4h à 37°C avec 10µM de lactacystine. S'il y a participation du protéasome cytosolique ou s'il y a translocation vers le cytoplasme pour dégradation par ce complexe protéolytique, comme il a été suggéré précédemment (Bebök *et al.*, 1998), alors nous devrions

observer l'accumulation de formes intermédiaires et surtout détecter la présence de CFTR-F508del dans la FC. Les résultats, indiqués dans la **figure R18**, montrent d'une part une accumulation dans la FM et, d'autre part, l'absence de détection dans la FC après traitement par la lactacystine. Ces résultats montrent encore une fois que la protéine CFTR-F508del n'est pas dégradée par le protéasome cytosolique et qu'elle n'est pas transloquée pour dégradation vers le cytoplasme.

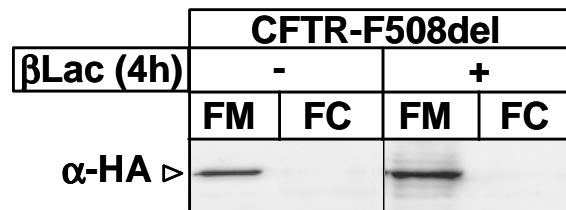


Figure R18: Rôle du protéasome cytosolique dans la dégradation de CFTR-F508del.

50 µg de protéines provenant des fractions microsomale (FM) et cytoplasmique (FC), préparées par centrifugation différentielle (voir **Matériels et Méthodes**) à partir des cellules BHK-21 exprimant de façon stable la protéine CFTR-F508del, ont été séparées sur gel de 7%, électro-transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature.

B. Fraction microsomale obtenue par fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose

Comme nous l'avons précisé au début de ce chapitre, l'étude de la dégradation de CFTR-F508del dans une fraction riche en RE, nous permettra de nous affranchir des compartiments présents dans la FM et de vérifier si cette dégradation a bien lieu dans le RE ou dans un compartiment intermédiaire (Fu et Sztul, 2003).

1- Caractérisation enzymatique du fractionnement sur gradient de sucrose

Avant toute chose, il est nécessaire de caractériser les différentes fractions obtenues après fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose. Pour cela 29 fractions ont été prélevées de la plus dense (1) à la moins dense (29). Nous avons réalisé sur ces fractions un dosage enzymatique des marqueurs spécifiques de chaque compartiment cellulaire (RE, lysosome, Golgi et membrane plasmique). Les valeurs de l'activité spécifique (AS) mesurée pour chaque marqueur, sont représentées en pourcentage (%) sur la **figure R19 A**. Par la suite, uniquement les fractions 1-3 ont été collectées. Ces fractions présentent le pourcentage d'enrichissement en α-glucosidase II, marqueur du RE, le plus élevé par rapport aux autres

fractions (**Figure R19 B**). Nous les appelons FRE (Fraction enrichie en RE) pour la suite de notre étude.

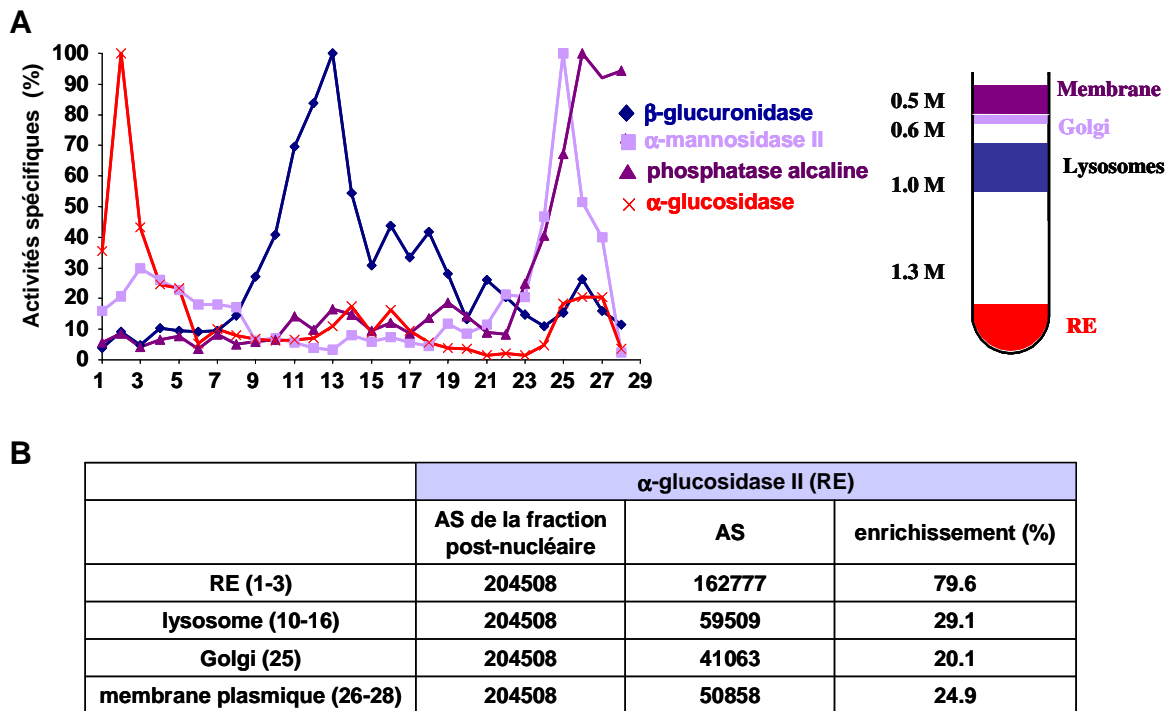


Figure R19: Caractérisation enzymatique des différentes fractions obtenues après séparation sur gradient de sucrose

A: Activités spécifiques des marqueurs du RE (α -glucosidase II), du Golgi (α -mannosidase), des lysosomes (β -glucuronidase) et de la membrane plasmique (phosphatase alcaline) mesurées dans les fractions obtenues par fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose de la fraction post-nucléaire (voir **Matériels et Méthodes**).

B: Pourcentage d'enrichissement en α -glucosidase II, marqueur du RE, des différentes fractions par rapport à la fraction post-nucléaire.

2- Caractérisation de la FRE

∞ Taux en ATP

Comme pour la FM, la FRE, enrichie en RE, obtenue sur gradient de sucrose présente une très faible concentration en ATP (~3,9%) par rapport aux cellules intactes (**Figure R20**). Ces résultats montrent que l'utilisation, soit de la centrifugation différentielle, soit du fractionnement subcellulaire, permet d'obtenir une fraction quasi déplétée en ATP.

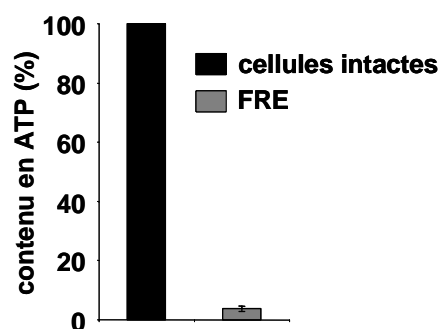
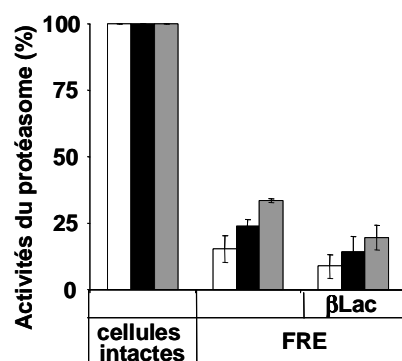


Figure R20: Détection du contenu en ATP dans la FRE.

Le contenu en ATP (indiqué en %), dans les cellules intactes et dans la FRE, a été mesuré à l'aide du kit luciférase.

∞ Activités protéasomales

De la même manière que pour la FM, nous avons mesuré l'activité protéasomale et l'effet de la clasto-Lactacystine β -lactone sur cette activité dans la FRE. Les résultats montrent une activité plus faible (~20%) par rapport à celle trouvée dans la FM (~40%) et une inhibition d'~ 35% avec la clasto-Lactacystine β -lactone (**Figure R21**). Ceci indique que la majorité de l'activité protéasomale détectée dans la FM réside dans la FRE, et confirme le fait que cette activité est ATP-indépendante, mais détectée en utilisant les substrats caractéristiques du protéasome (Bogyo *et al.*, 1997). Nous avons qualifié cette activité d'activité protéasome-like.

**Figure R21: Activités du protéasome détectées dans la FRE.**

Les substrats (0,1mM) utilisés pour mesurer les trois activités caractéristiques du protéasome sont : GGR pour la trypsin-like (T-L) ; LLVY pour la chymotrypsin-like (Ch-L) ; LLE pour la PGPH. Les activités ont été mesurées en fluorimétrie ($\lambda_{ex} = 395\text{nm}$; $\lambda_{em} = 440\text{nm}$) à TA en présence et en absence de la clasto-Lactacystine β -lactone (β Lac, 10 μ M). Ces activités sont représentées en % par rapport à l'activité déterminée dans les cellules intactes.

3- Dégradation de CFTR-F508del à 37°C et à 26°C

Nous avons, par la suite, déterminé l'expression et le profil de dégradation de CFTR-F508del dans la FRE, en présence et en absence des différents inhibiteurs du protéasome. Nos résultats montrent, d'abord, que la protéine CFTR-F508del est détectée dans la FRE. Ceci confirme son expression exclusivement réticulaire. A 37°C, la protéine est dégradée avec la même vitesse que dans la FM (~30min) (**Figure R22 A, C**). Cette dégradation est ralentie en présence de clasto-Lactacystine β -lactone, de MG132, de DMSO et de l'EDTA, alors que l'Hémine reste sans effet (**Figure R22 A, C**). Le profil de dégradation et d'inhibition de la protéine CFTR-F508del à 26°C est identique à celui obtenu dans la FM (**Figure R22 B, C**).

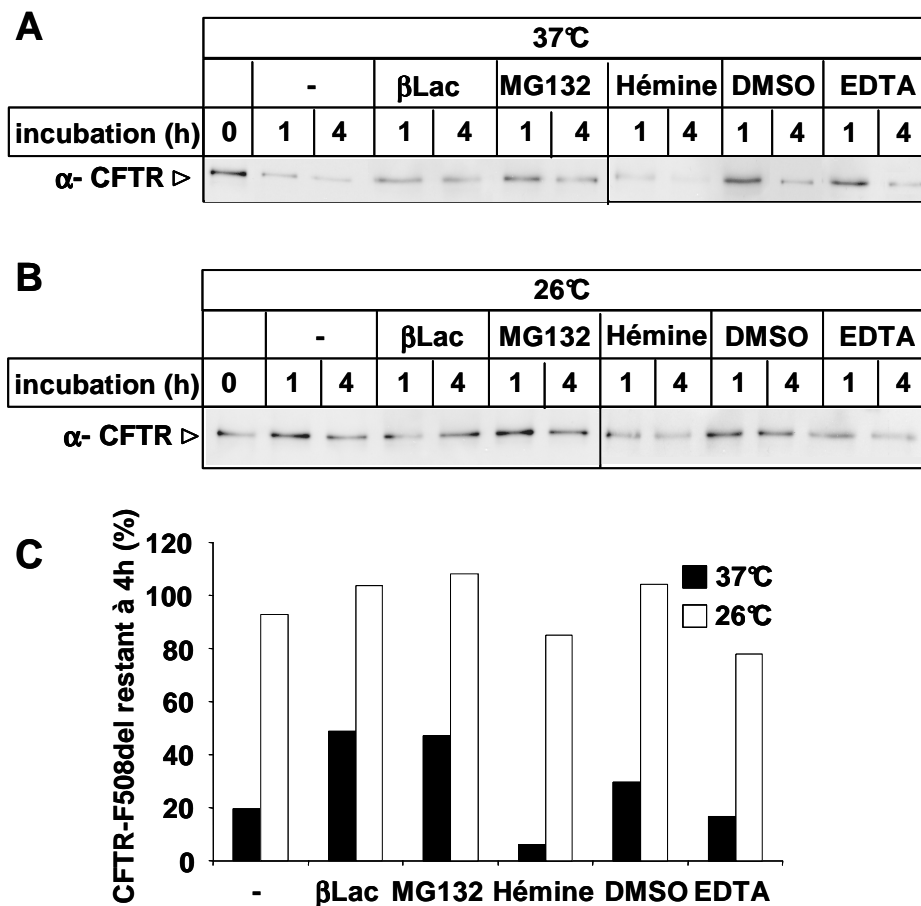


Figure R22: Profil d'inhibition de la dégradation de CFTR-F508del à 37°C et 26°C.

La FRE incubée soit à 37°C soit à 26°C en présence ou on absence de clasto-Lactacystine β-lactone (βLac, 10μM), MG132 (10μM), Hémine (40μM), DMSO (10%) et EDTA (1mM) au cours du temps. La même quantité de protéine (50 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-CFTR (L12B4) et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature.

A: Dégradation de CFTR-F508del à 37°C.

B: Dégradation de CFTR-F508del à 26°C.

C: Pourcentage de CFTR-F508del restant après 4h de traitement à 37°C ou à 26°C par rapport à la valeur initiale de CFTR-F508del à t=0. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne ± S.E. (n = 3).

L'ensemble de ces résultats montre que la dégradation et l'inhibition de la protéine CFTR-F508del dans la FM et la FRE sont identiques. Ceci suggère que sa dégradation est bien localisée dans le RE et que d'autres compartiments n'interviennent pas dans ce processus.

Ainsi, nous avons montré que la protéine CFTR-F508del est localisée et dégradée au niveau du RE. L'activité protéasomale détectée à ce niveau et caractérisée uniquement par l'effet de la lactacystine, et par l'utilisation de substrats qui lui sont spécifiques, participe partiellement à cette élimination. Cependant, cette activité ne semble pas être dépendante de l'ATP.

Il ressort donc de nos résultats qu'une autre voie protéolytique, dont la nature reste encore inconnue, participe à cette dégradation. Ce processus, associé au RE, est lactacystine-indépendant et surtout ATP-indépendant.

III/ Rôle du GTP dans la dégradation de CFTR-F508del

Au niveau du RE, la dégradation des protéines transmembranaires incorrectement repliées et/ou incorrectement assemblées fait appel à des processus complexes. A ce jour, le dénominateur commun de ces différents processus est l'utilisation de l'ATP. En effet, ce nucléotide est important pour les protéines chaperonnes, l'ubiquitination, l'assemblage du protéasome et surtout pour l'hydrolyse protéolytique. Cependant, dans le cas de la protéine CFTR-F508del, l'ATP ne semble pas influencer sa dégradation.

Dans la cellule, d'autres nucléotides sont aussi importants que l'ATP. C'est le cas du GTP (Guanosine Nucléotide Triphosphate). Ce nucléotide est aujourd'hui reconnu comme une molécule clé dans de nombreux processus cellulaires tels que le trafic vésiculaire, la migration ou encore la division cellulaire (Pall, 1985) (**Figure R23**)

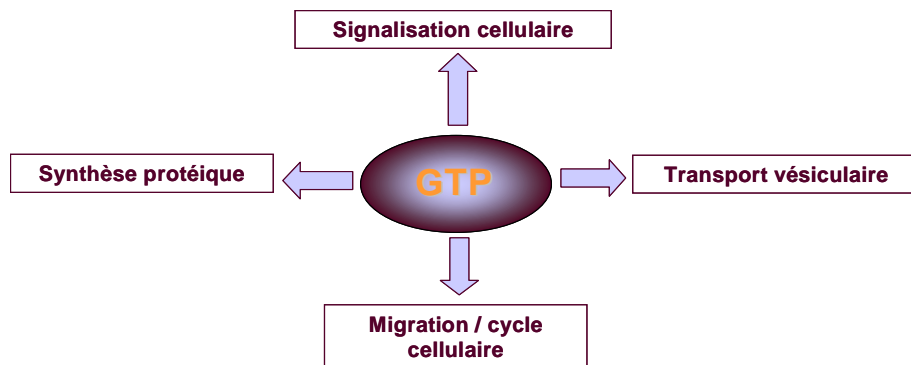


Figure R23: Rôles du GTP dans les différents processus cellulaires.

Ainsi, dans la deuxième partie de mon travail, j'ai entrepris, à l'échelle cellulaire et réticulaire, la caractérisation du rôle du GTP, jusqu'alors inconnu, dans la dégradation de CFTR-F508del.

A. Contenu nucléotidique et viabilité cellulaire

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la synthèse du GTP, dont l'IMPDH (Inosine MonoPhosphate DésHydrogénase), qui peut être inhibée spécifiquement par l'acide

mycophénolique (MPA), agent immunodépresseur utilisé dans la prévention contre les rejets de greffe (Escobar-Henriques *et al.*, 2001). Ce composé permet de dépléter les cellules spécifiquement en GTP sans modifier la concentration en ATP.

Nous avons, dans un premier temps, caractérisé la déplétion en GTP en mesurant sa concentration par HPLC (**voir Matériels et Méthodes**). Les résultats montrent que après 60min de traitement avec du MPA (50 μ M), la concentration intracellulaire en GTP est abaissée d'~ 80% alors que l'ATP se maintient à une concentration d'~ 90% (**Figure R24 A**). Les mêmes résultats ont été obtenus avec des temps de déplétion allant jusqu'à 24h. Par ailleurs, nous avons aussi vérifié que le traitement avec le MPA n'induit pas de mortalité cellulaire significative. En effet, nous avons déterminé le pourcentage de cellules vivantes, nécrosées ou apoptotiques après traitement par le MPA (50 μ M), en comptabilisant le nombre de cellules marquées au Hoeschst et à l'iodure de propidium par microscopie à fluorescence. Les résultats montrent une quasi-absence de mortalité (~ 10%) par rapport aux cellules non traitées (**Figure R24 B**).

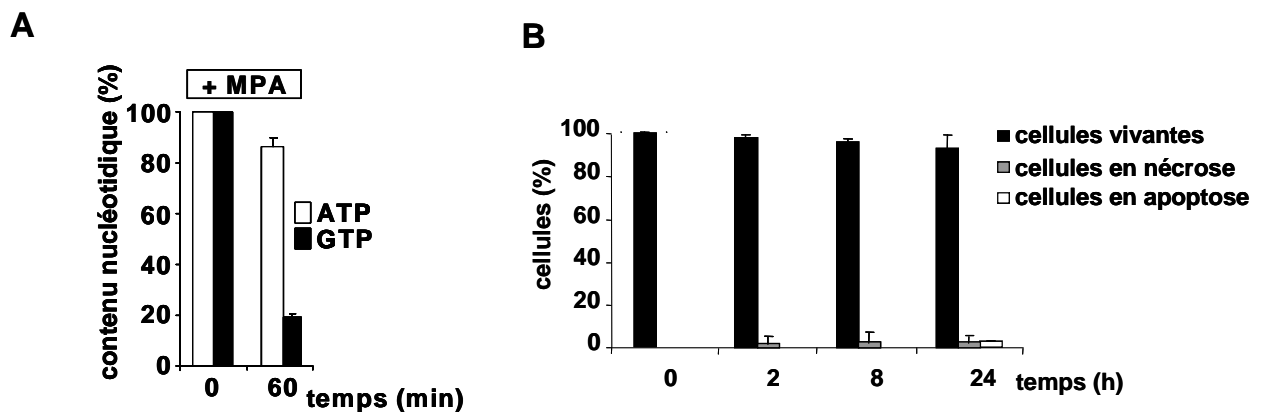


Figure R24: Mesure du contenu cellulaire en ATP et en GTP.

A. Les cellules BHK-21 exprimant de façon stable la protéine CFTR-F508del ont été traitées par 50 μ M d'acide mycophénolique (MPA). Le contenu en ATP et en GTP dans ces cellules a été mesuré par HPLC après extraction nucléotidique avec 100% d'acétonitrile. Les résultats sont représentés en % par rapport à la quantité d'ATP et de GTP dans les cellules non traitées (t=0).

B : Détermination du pourcentage de cellules nécrosées (coloration par l'iodure de propidium) et apoptotiques (fragmentation des noyaux observée par coloration au Hoeschst) au cours de la déplétion en GTP.

B. Effet du MPA sur la dégradation de CFTR-F508del

Par la suite, nous avons cherché l'effet du traitement par le MPA sur la stabilité de CFTR-F508del. Ainsi, par rapport à la CHX seule, l'addition de 50 μ M de MPA, au cours du temps, ralentit d'une façon spectaculaire la dégradation de CFTR-F508del ($T_{1/2}$ ~180min)

(**Figure R25 A, B**). Pour vérifier que cet effet est directement lié à la déplétion en GTP et qu'il n'est pas la conséquence d'un effet potentiel du MPA sur d'autres protéines (Escobar-Henriques *et al.*, 2001), nous avons rajouté de la guanine (G, 500 μ M), source de GTP complémentaire à celle contrôlée par le MPA. Dans ces conditions, nous avons aboli l'effet du MPA (**Figure R25 A**). Ce résultat montre, pour la première fois, l'implication du GTP dans l'élimination rapide de CFTR-F508del.

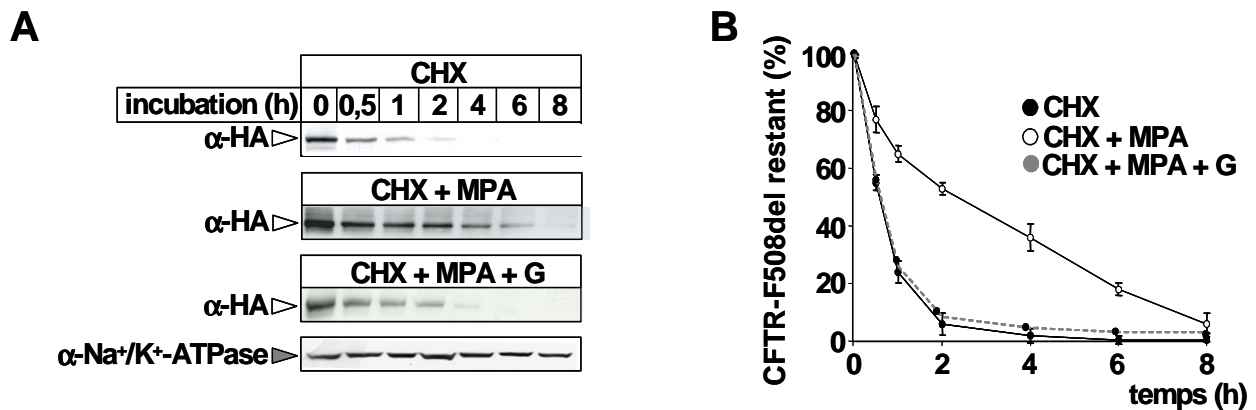


Figure R25: Effet de la déplétion en GTP sur la demi-vie de CFTR-F508del.

Les cellules BHK exprimant de façon CFTR-F508del ont été incubées en présence de CHX (100 μ g/mL) en absence et en présence de MPA (50 μ M) et de guanine (G, 500 μ M).

A: Disparition de CFTR-F508del au cours du temps. 70 μ g de protéines ont été déposées par puits, séparées sur gel de 7%, électro-transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. L'anticorps monoclonal anti-Na⁺/K⁺-ATPase détecte la sous-unité alpha. La flèche vide indique la forme immature de CFTR.

B: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne \pm S.E. (n = 6).

C. Effet de la déplétion en GTP sur la voie ubiquitine/protéasome

Les résultats de l'effet de la déplétion en GTP sur la dégradation de CFTR-F508del peuvent être la conséquence d'une inhibition de l'activité protéasomale et/ou de l'ubiquitination des protéines incorrectement repliées. Pour mieux caractériser l'effet du MPA, nous avons mesuré l'activité du protéasome et l'ubiquitination totale dans les conditions utilisées pour suivre la dégradation de CFTR-F508del. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a d'effet notable ni sur l'activité du protéasome (**Figure R26 A**) ni sur l'ubiquitination totale des protéines, alors que le traitement avec la lactacystine (Lac, 10 μ M) provoque l'accumulation de protéines polyubiquitinylées (**Figure R26 B**)

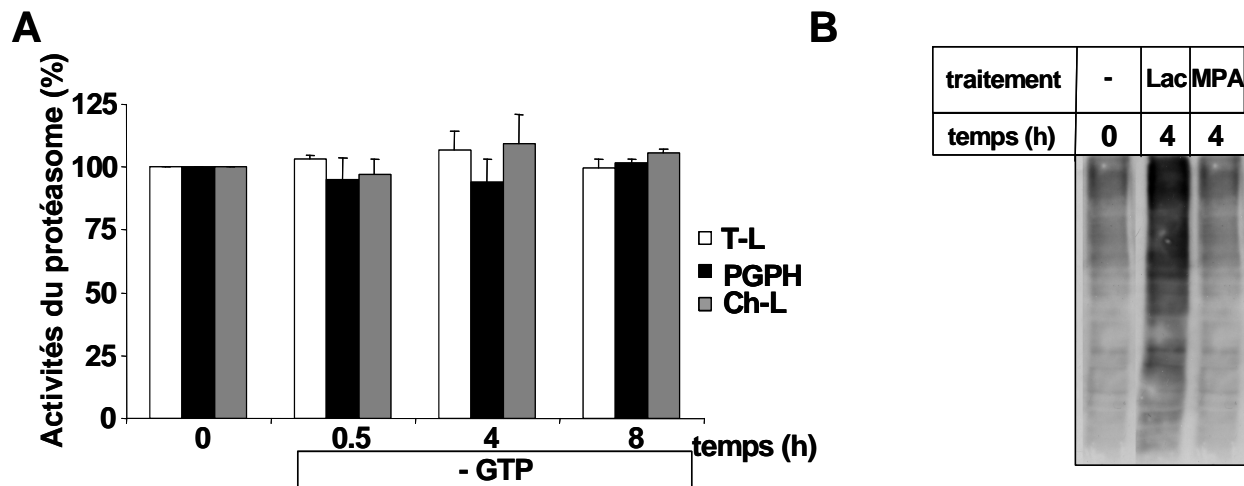


Figure R26: Caractérisation de l'activité du protéasome et de l'ubiquitination totale au cours de la déplétion en GTP.

A. Les substrats (0,1mM) utilisés pour mesurer les trois activités caractéristiques du protéasome sont : GGR pour la trypsin-like (T-L) ; LLVY pour la chymotrypsin-like (Ch-L) ; LLE pour la PGPH. Les activités ont été mesurées en fluorimétrie ($\lambda_{ex} = 395nm$; $\lambda_{em} = 440nm$) à TA en présence et en absence de MPA (50 μ M). Ces activités sont représentées en % par rapport à l'activité déterminé dans les cellules non traitées.

B: Ubiquitination totale des protéines révélée après 4h de traitement par la lactacystine (lac, 10 μ M) ou le MPA (50 μ M). La même quantité de protéine (50 μ g) a été déposée par puits, séparée sur gel de 12%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-Ub et le kit ECL.

Par conséquent, l'effet de la déplétion en GTP ne passe pas par l'inhibition du protéasome ni par la modification de l'ubiquitination des protéines.

D. Effet du MPA sur l'expression des ARNm de CFTR

Une autre possibilité, pour expliquer les résultats obtenus, est l'effet possible du MPA sur la biosynthèse de CFTR-F508del.

Pour vérifier cette possibilité, nous avons quantifié l'ARNm de CFTR par PCR semi-quantitative (**voir Matériels et Méthodes**) après traitement, soit en présence de CHX, soit de MPA. Le gène de la β -actine a été choisi comme standard interne. Par rapport au contrôle (C, cellules non traitées), ces expériences nous ont permis de vérifier que ces traitements n'augmentent ni la transcription du gène CFTR, ni la stabilité de son ARNm (**Figure R27 A, B**). En effet, la déplétion en GTP ne modifie pas significativement le coefficient R, qui correspond au rapport de la quantité d'ARNm de CFTR amplifié par RT-PCR sur celle de la

β -actine. Par ailleurs, nous avons aussi vérifié que la déplétion en ATP est sans effet (**Figure R27 A, B**).

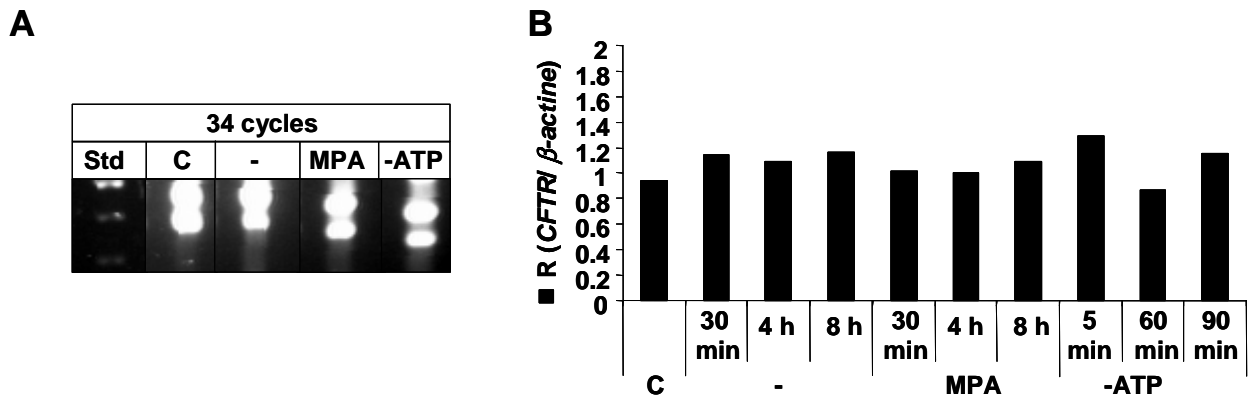


Figure R27: Détermination du taux de transcrits du gène *CFTR*.

A: L'ARNm a été extrait à partir de cellules BHK-21 exprimant de façon stable la protéine CFTR-F508del et traitées, soit par la CHX (100 μ g/mL), soit par le MPA (50 μ M) ou cultivées en présence du milieu de déplétion en ATP (-ATP). Cet ARNm a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse, amplifié par 34 cycles de PCR, séparé sur gel d'agarose à 2% et révélé par le BET. Les cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle (C).

B: Calcul du coefficient R qui représente le rapport de la quantité d'ARNm de *CFTR-F508del* sur celle de la β -actine.

Ainsi, nous avons montré que la déplétion en GTP par le MPA permet de ralentir la dégradation de CFTR-F508del. Cet effet passe par des protéines dépendantes du GTP et n'est pas lié à la voie ubiquitine/protéasome.

IV/ Implication de l' AlF_4^- dans la dégradation de CFTR-F508del

Le MPA déplete spécifiquement en GTP et, par conséquent, inhibe les GTPases ou protéines G. En effet, ces enzymes utilisent le GTP pour réguler différents processus cellulaires tels que la traduction, la signalisation, la croissance cellulaire, le trafic intracellulaire... (Pall, 1985). Les GTPases peuvent être divisées en deux familles : les petites protéines G monomériques comme Ras, et les protéines G hétérotrimériques liées à la membrane. Comme le MPA ne nous permet pas de cibler spécifiquement une de ces deux familles, nous avons utilisé l' AlF_4^- qui est un complexe fluoroaluminate connu pour mimer le γ -phosphate du GTP sur les protéines G (Liang, 2003), avec une préférence pour la sous-unité α des protéines G hétérotrimériques (Inoue *et al.*, 1990 ; Roa *et al.*, 1993). L' AlF_4^- bloque la protéine G dans son état de transition (Protéine-GDP + P) en prenant la place du γ -phosphate après hydrolyse du GTP (Protéine-GDP- AlF_4^-). Ainsi la protéine G reste dans son état dit actif mais bloquant son activité GTPasique (**Figure R28**). Ce complexe est donc idéal pour compléter nos résultats préalablement obtenus avec la déplétion en GTP.

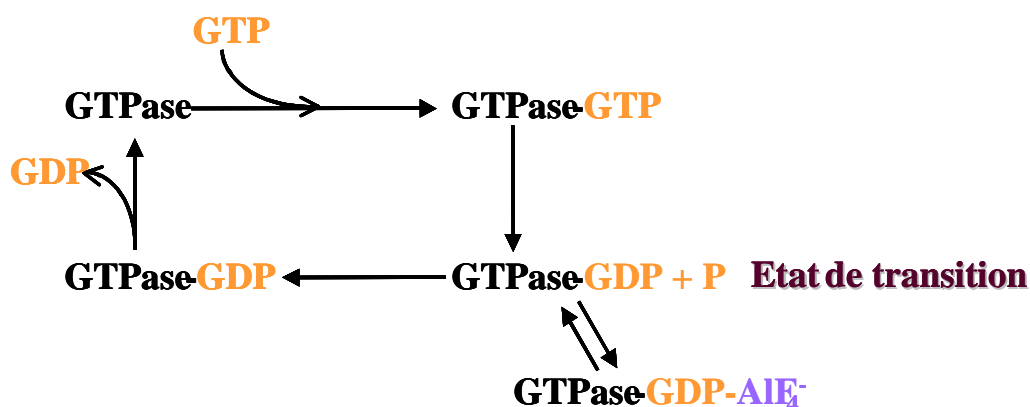


Figure R28: Cycle d'activation des protéines G.

A. Effet de l' AlF_4^- sur la dégradation de CFTR-F508del

1- Obtention du complexe fluoroaluminate AlF_4^-

L' AlF_4^- est un complexe qui n'existe pas dans la nature. Il est le résultat de la présence simultanée, dans une solution aqueuse, de fluorure de sodium (NaF) et de chlorure d'aluminium (AlCl_3). La formation de ce complexe dépend de la température, du pH ainsi que de la concentration des deux précurseurs (Liang, 2003). Les différentes concentrations d' AlF_4^- (**Tableau RIII**) ont été calculées en utilisant le logiciel TOT, logiciel qui permet de calculer les concentrations de toutes les espèces présentes dans une solution contenant jusqu'à 17

complexes ioniques en équilibre. Dans notre cas, il nous a permis, à partir de concentrations connues de NaF et d' AlCl_3 de déterminer celle d' AlF_4^- . Les résultats indiqués dans le **tableau RIII** montrent les concentrations obtenues à pH 7,2. D'autres complexes fluoroaluminates sont aussi formés durant cette réaction (Liang, 2003). Le plus important est le complexe AlF_3 . Ce dernier peut aussi être obtenu par synthèse chimique (Sigma, France)

Tableau RIII: Calcul des concentrations d' AlF_4^- et d' AlF_3 à pH 7,2 à l'aide du logiciel TOT

NaF (mM)	AlCl_3 (μM)	AlF_4^- (μM)	AlF_3 (μM)
2	50	10,1	0,8
3	5	1,6	0,9
5	50	22,9	7,7

2- Effet de NaF, AlCl_3 , d' AlF_3 et d' AlF_4^- sur la viabilité cellulaire

Avant d'étudier l'action de ces molécules sur la dégradation de la protéine CFTR-F508del nous avons d'abord déterminé leurs effets sur la mortalité cellulaire. Ainsi, les cellules BHK-21 exprimant de façon stable CFTR-F508del, ont été traitées durant 8h soit par le NaF, l' AlCl_3 et l' AlF_3 , soit de manière individuelle, soit en combinant le NaF et l' AlCl_3 pour produire le complexe AlF_4^- . Le nombre de cellules mortes a été déterminé par coloration au bleu trypan. Les résultats indiqués sur la **figure R29 A, B** montrent que le traitement par ces différentes espèces n'affecte pas la viabilité cellulaire.

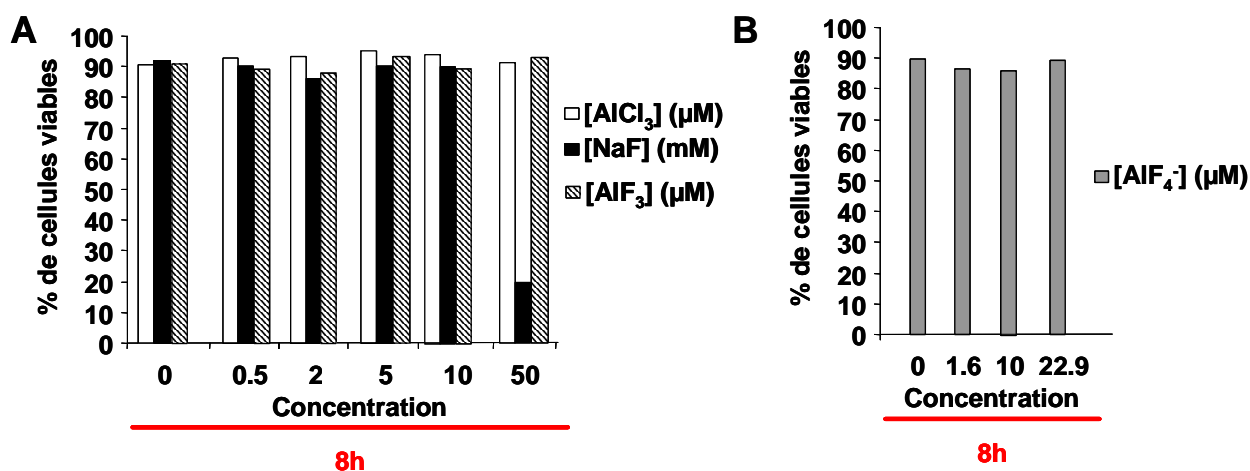


Figure R29: Effet de l' AlCl_3 , du NaF, de l' AlF_4^- et de l' AlF_3 sur la viabilité cellulaire. A et B. Détermination du pourcentage de cellules viables (coloration par le bleu trypan) après 8h de traitement par les différentes molécules testées.

3- Effet du NaF, de l' AlCl_3 , de l' AlF_3 sur la dégradation de CFTR-F508del

Etant donné que la molécule d' AlF_4^- est obtenue à partir d'un mélange de NaF et d' AlCl_3 qui produit aussi, mais très faiblement, le complexe AlF_3 , nous avons d'abord testé, individuellement, l'effet de ces différentes molécules (NaF, AlCl_3 et AlF_3), sur la dégradation de CFTR-F508del. Les résultats indiqués sur la **figure R30** montrent clairement que ces trois molécules n'affectent en aucun cas la demi-vie de CFTR-F508del ($T_{1/2} \sim 40$ min).

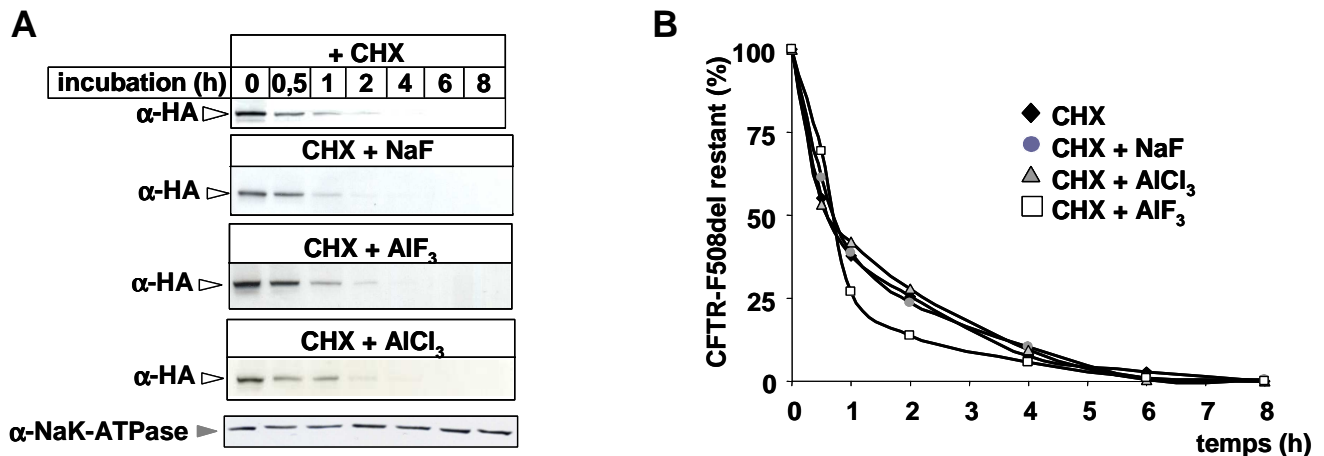


Figure R30: Effet du NaF, de l' AlF_3 et de l' AlCl_3 sur la demi-vie de CFTR-F508del.

A: La disparition de CFTR-F508del a été suivie en présence de CHX (00 $\mu\text{g/mL}$) seule ou en présence de NaF (2mM), d' AlF_3 (10 μM) ou d' AlCl_3 (50 μM). La même quantité de protéine (70 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel d'acrylamide à 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose puis révélée par immunodétection en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. L'anticorps monoclonal anti- Na^+/K^+ -ATPase détecte la sous-unité alpha. La flèche vide indique la forme immature de CFTR-F508del.

B: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à $t=0$ en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne \pm S.E. ($n = 3$).

4- Effet de l' AlF_4^- sur l'expression et la dégradation de CFTR-F508del

En absence d'effet des molécules NaF, AlCl_3 et AlF_3 , nous avons entrepris l'étude du rôle de l' AlF_4^- sur la disparition de CFTR-F508del.

Dans un premier temps, nous avons étudié son effet sur l'expression basale de CFTR-F508del en fonction de la concentration et du temps. Par immunodétection, nous avons observé une augmentation significative de la quantité de CFTR-F508del, surtout pour une concentration de 10 μM d' AlF_4^- (**Figure R31 A**). A cette concentration, un traitement au cours du temps augmente l'expression de CFTR-F508del pour atteindre à 12h une augmentation d' ~ 6 fois par rapport à $t=0$ (**Figure R31 B**).

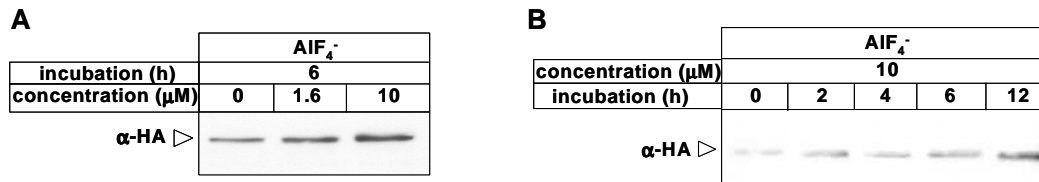


Figure R31: L'effet de l' AIF_4^- sur l'expression basale de CFTR-F508del

Les cellules BHK-21 exprimant CFTR-F508del ont été traitées, soit pendant 6h avec différentes concentrations d' AIF_4^- (**Tableau RIII**), soit avec $10\mu\text{M}$ d' AIF_4^- en fonction du temps. La même quantité de protéine ($70\mu\text{g}$) a été déposée par puits, séparée sur gel d'acrylamide à 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose puis révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature.

A: Expression basale en fonction de la concentration d' AIF_4^-

B: Expression basale de CFTR-F508del en fonction du temps.

Dans un deuxième temps, l'effet de l' AIF_4^- sur la dégradation de CFTR-F508del a été suivi en présence de CHX, afin de suivre un pool de protéines données. Nous avons choisi la concentration pour laquelle nous avons observé une forte expression de CFTR-F508del, soit $10\mu\text{M}$ d' AIF_4^- . Dans ces conditions, nous avons observé que la dégradation de la forme immature est ralenti avec une $T_{1/2}$ qui passe de $\sim 35\text{min}$ à $\sim 90\text{min}$ (**Figure R32 A, B**). Ces résultats expliquent que l'augmentation de la quantité de protéine CFTR-F508del est due à une augmentation de la $T_{1/2}$ de la protéine en présence de l' AIF_4^- . Toutefois cette augmentation est deux fois moins importante que celle obtenue en présence de MPA.

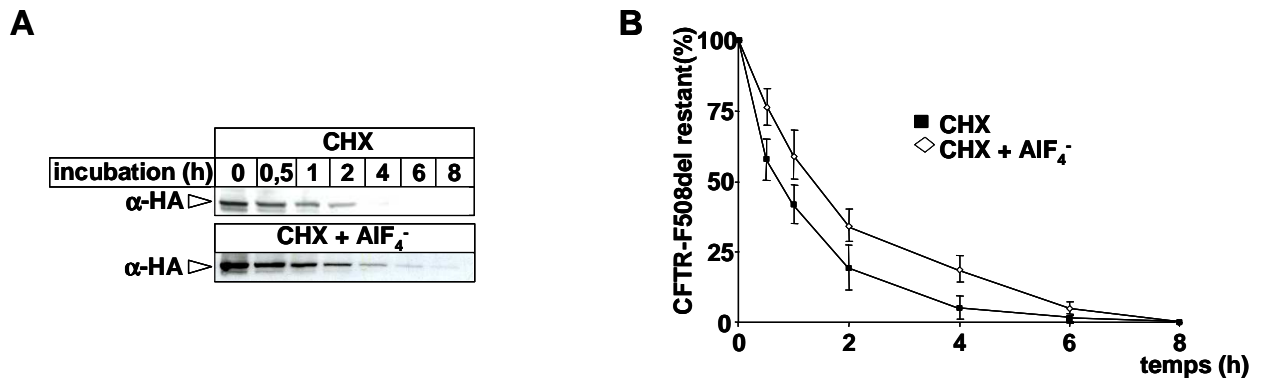


Figure R32: Effet de l' AIF_4^- sur la dégradation de CFTR-F508del.

A: La disparition de CFTR-F508del a été suivie en présence de CHX ($100\mu\text{g/mL}$) seule ou en présence de $10\mu\text{M}$ d' AIF_4^- . La même quantité de protéine ($70\mu\text{g}$) a été déposée par puits, séparée sur gel d'acrylamide à 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose puis révélée par immunodétection en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature.

B: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à $t=0$ en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne \pm S.E. ($n = 5$).

Ces résultats, pour la première fois, montrent que la dégradation de la protéine CFTR-F508del est ralenti par un inhibiteur des protéines GTPases. Ceci constitue une preuve supplémentaire en faveur du rôle du GTP dans la protéolyse de CFTR mutée. De plus, bien

qu'il a été initialement mentionné que l' AlF_4^- interagit avec les sous-unité α des protéines G (Kahn, 1991), des études récentes ont montré que l' AlF_3 pouvait se lier aux petites GTPases comme Ras, Rab... (Wittinghofer, 1997). Nous avons montré que la dégradation de CFTR-F508del (**Figure R30**) n'est affectée pas par l' AlF_3 , suggérant que la cible de l' AlF_4^- est une protéine G hétérotrimérique.

5- Activité du protéasome et ubiquitination totale

Comme pour les GTPases, l' AlF_4^- est une molécule capable, *in vitro*, de mimer le γ -phosphate de l'ATP chez les ATPases, et par conséquent d'inhiber leur activité ATPasique. Ceci pourrait être à l'origine de l'inhibition des activités ATPasiques du protéasome 20S ou des différentes enzymes de la voie ubiquitine/protéasome. Les mesures d'activités protéolytiques du protéasome, comme indiquées précédemment, après traitement par $10\mu\text{M}$ d' AlF_4^- montrent que ce dernier n'affecte pas les trois principales activités du 20S (**Figure R33 A**). De la même manière que pour le MPA, nous n'avons pas observé d'effet de l' AlF_4^- sur l'ubiquitination totale (**Figure R33 B**).

L'ensemble de ces résultats montre que le système ubiquitine/protéasome ne fait pas parti des cibles potentielles de l' AlF_4^- .

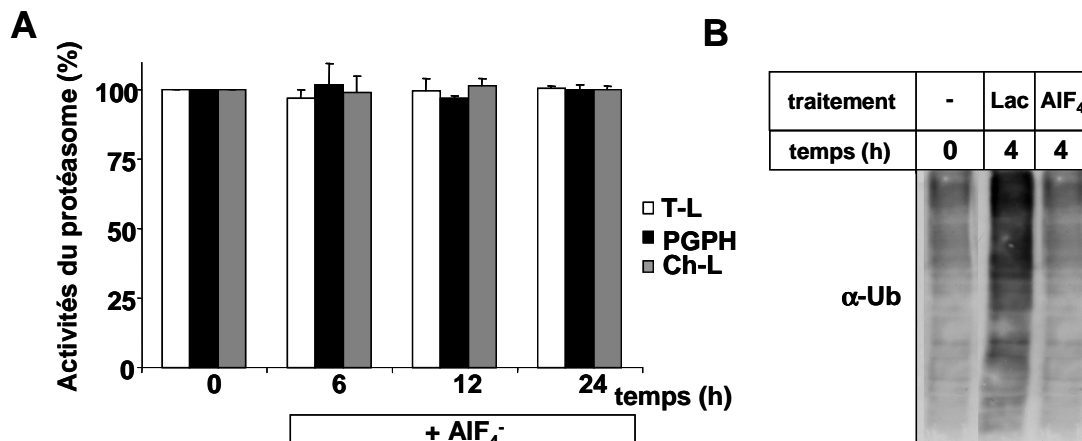


Figure R33: Caractérisation de l'effet de l' AlF_4^- sur l'activité du protéasome et l'ubiquitination totale.

A: Les substrats ($0,1\text{mM}$) utilisés pour mesurer les trois activités caractéristiques du protéasome sont : GGR pour la trypsin-like (T-L) ; LLVY pour la chymotrypsin-like (Ch-L) ; LLE pour la PGPH. Les activités ont été mesurées en fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) à TA en absence ($t=0$) et en présence d' AlF_4^- ($10\mu\text{M}$) à différents temps. Ces activités sont représentées en % par rapport à l'activité déterminé dans les cellules non traitées.

B: Ubiquitination totale des protéines révélée après 4h de traitement par la lactacystine (Lac, $10\mu\text{M}$) ou par l' AlF_4^- ($10\mu\text{M}$). La même quantité de protéine ($50 \mu\text{g}$) a été déposée par puits, séparée sur gel de 12%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-Ub et le kit ECL.

B. Effet de l' AlF_4^- sur l'interaction de CFTR-F508del avec les chaperonnes

Les protéines chaperonnes, qui participent au contrôle de la qualité du repliement et à la dégradation des protéines incorrectement repliées et/ou incorrectement assemblées, sont principalement des ATPases (Hartl, 1996). Ces protéines agissent par interaction avec la protéine cible après avoir été activées par fixation et hydrolyse d'ATP. *In vitro*, ces protéines sont aussi capables de fixer le GTP, mais de manière très labile (Liberek *et al.*, 1991).

Un certain nombre de ces chaperonnes a été impliqué dans la reconnaissance et la dégradation de CFTR-F508del (Yang *et al.*, 1993 ; Pind *et al.*, 1994 ; Loo *et al.*, 1998). Dans notre cas, nous pouvons légitimement penser que la déplétion en GTP, ou l'utilisation de l' AlF_4^- , pourrait influencer la stabilité du complexe CFTR-F508del-chaperonnes. Pour cela, nous avons étudié l'interaction de CFTR-F508del avec la calnexine (CNX), Hsp70 et Hsp90 avant et après 4h de traitement, soit par la lactacystine, l' AlF_4^- ou le MPA. La mise en évidence de l'interaction a été réalisée par immunoprécipitation et révélation par immunodétection. Il ressort de ces résultats que ni la déplétion en GTP après traitement par le MPA, ni le traitement par l' AlF_4^- n'altèrent l'interaction entre CFTR-F508del et ces chaperonnes (**Figure R34**). Le même résultat a été obtenu avec le contrôle (CHX) ou après traitement avec la lactacystine (**Figure R34**). Ces résultats confirment que l'effet du GTP et de l' AlF_4^- ne passe pas par les protéines chaperonnes.

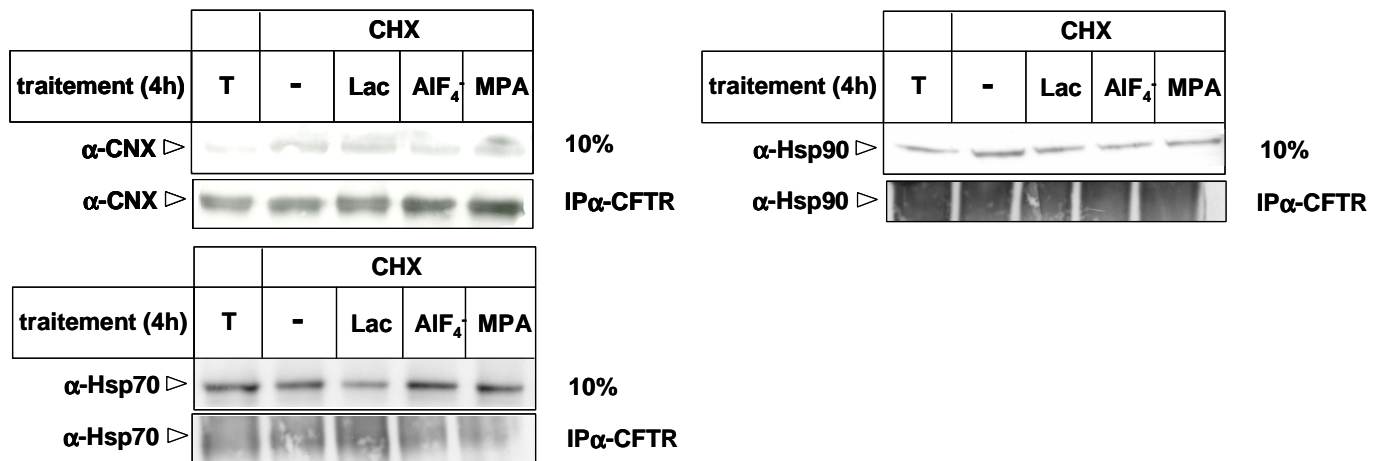


Figure R34: Interaction entre la protéine CFTR-F508del et les protéines chaperonnes.

Les cellules BHK-21 exprimant CFTR-F508del ont été traitées pendant 4h en présence de 100µg/mL de CHX seule ou en présence de 10µM de lactacystine, de 10µM d' AlF_4^- , ou de 50µM de MPA. La protéine CFTR-F508del a été immunoprécipitée avec les anti-CFTR (L12B4 et M3A7) et la présence des protéines chaperonnes a été révélée à l'aide du kit ECL par immunodétection en utilisant l'anti-CNX, l'anti-Hsp70 et l'anti-Hsp90, après séparation sur gel d'acrylamide à 12%, électro-transfert sur membrane de nitrocellulose.

C. Effet de l' AlF_4^- sur la fixation de l'ATP au niveau des domaines NBDs

Il a été montré que l'ATP et de façon moindre le GTP pouvait se fixer sur les NBDs de CFTR (Anderson *et al.*, 1991 ; Anderson et Welsh, 1992). L' AlF_4^- , en mimant le γ -phosphate, principalement de l'ATP au niveau des NBDs, pourrait empêcher la fixation de l'ATP, voir du GTP, et par conséquent inhiber la dégradation de CFTR-F508del, probablement par changement de son niveau de repliement global.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de fixation de CFTR-F508del sur colonnes de sépharose-ATP ou -GTP et élution en présence d'ATP, de GTP ou d' AlF_4^- . Les résultats de ces expériences montrent d'abord que la protéine CFTR-F508del se fixe préférentiellement sur l'ATP (**Figure R35**). Deuxièmement, par rapport à l'ATP, l' AlF_4^- élue faiblement la protéine CFTR-F508del. Ce résultat est confirmé par la quantité de CFTR élue de la colonne ATP, après traitement par l'agent réducteur, β -mercaptoéthanol (**Figure R35**). L'ensemble de ces résultats montre que l'effet de l' AlF_4^- ne passe pas par une fixation sur les NBDs.

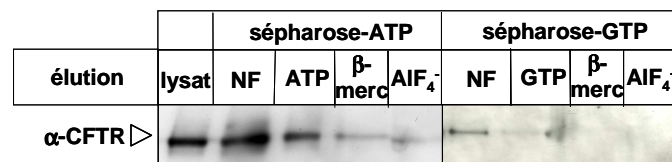


Figure R35: Profil d'élution de CFTR-F508del après fixation le long de colonnes d'ATP et de GTP.

Des extraits cellulaires de CFTR-F508del (lysats) sont déposés sur des colonnes de sépharose-ATP et -GTP. Après 1h d'incubation à 4°C, les protéines non fixées (NF) ont été récupérées ; après lavage par le tampon d'extraction (voir **Matériels et Méthodes**), les protéines fixées ont été successivement éluées par 10 μ M d' AlF_4^- , 5mM d'ATP/GTP. Les protéines, non éluées par ce procédé, ont été décrochées par incubation avec 10% de β -mercaptoéthanol (β -merc). Les échantillons obtenus ont été déposés sur gel d'acrylamide à 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose puis révélés par immunodétection en utilisant l'anticorps anti-CFTR (L12B4) et le kit ECL.

D. Effet d' AlF_4^- sur le trafic intracellulaire

L' AlF_4^- est utilisé pour moduler l'activité des protéines G impliquées dans le trafic vésiculaire (Roa *et al.*, 1993). Principalement, cette molécule a été utilisée pour caractériser le trafic entre le Golgi et la membrane plasmique (Hirschberg *et al.*, 1998). Afin de vérifier si l'effet observé avec l' AlF_4^- ne résulte pas de l'inhibition du trafic des vésicules entre le RE et le *cis*-Golgi, voie proposée pour la dégradation de CFTR-F508del (Fu et Sztul, 2003), nous avons suivi le trafic de la protéine chimère VSVG-GFP (Vesicular Stomatitis Virus G-GFP), exprimée de façon stable ou transitoire dans les cellules BHK-21 ou COS-1 respectivement,

en absence ou en présence de $10\mu\text{M}$ d' AlF_4^- . La protéine VSVG est une protéine dont l'adressage intracellulaire dépend de la température. Ainsi, lorsque les cellules sont cultivées à 40°C , cette protéine est confinée exclusivement dans le RE (Figure R36 A, a). Après passage à 32°C , elle est exportée vers l'appareil de Golgi, puis vers la membrane plasmique (Figure R36 A, b, c). Le traitement par l' AlF_4^- pendant 2,5h à température permissive (32°C) inhibe l'adressage vers la membrane plasmique (Figure R36 A, d), alors qu'il reste sans effet sur le trafic RE-Golgi (Figure R36 A d, h). Les mêmes résultats ont été trouvés en utilisant les cellules COS-1 transfectées transitoirement (Figure R36 A, e à h).

Par la suite, nous avons voulu étudier son effet, d'une manière plus spécifique, sur le trafic de la protéine CFTR-F508del connu pour être dépendant de la température (Sharma *et al.*, 2004). En effet, à 26°C et/ou en présence d'une chaperonne chimique, comme le glycérol, la protéine subit une maturation artificielle qui lui permet de quitter le RE et d'aller s'insérer dans la membrane plasmique, après passage au niveau du Golgi (Sato *et al.*, 1996). Pour cela, nous avons cultivé les cellules à 26°C en présence de glycérol et en absence ou en présence de $10\mu\text{M}$ d' AlF_4^- . Après 24h de traitement, nous avons observé que l' AlF_4^- n'inhibe pas le transport de la protéine CFTR-F508del vers la membrane plasmique (Figure R36 B). En effet, par rapport au contrôle (sans AlF_4^-) où nous observons une bande d' $\sim 170\text{kDa}$ correspondant à la forme complexe-glycosylée de CFTR-F508del, la présence d' AlF_4^- n'interfère pas avec la maturation observée à 26°C en présence de glycérol. Ces résultats montrent que l' AlF_4^- ne perturbe pas le trafic vésiculaire entre le RE et le Golgi.

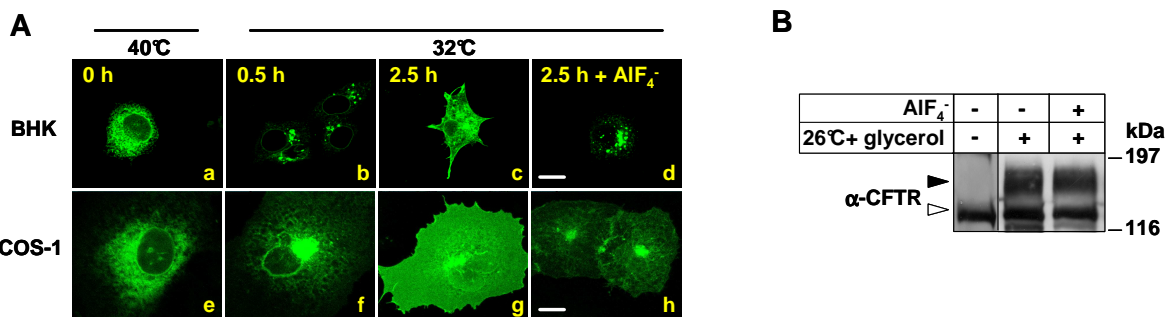


Figure R36: Effet de l' AlF_4^- sur l'export des protéines VSVG-GFP et CFTR-F508del.

A: Les cellules BHK-21 et COS-1 exprimant de façon stable et transitoire la protéine chimère VSVG-GFP, respectivement, ont été cultivées soit à 40°C (a, e) soit à 32°C (b, c, d, f, g, h), à différents temps, en absence ou en présence de $10\mu\text{M}$ d' AlF_4^- . La localisation de la protéine chimère a été visualisée grâce à l'auto-fluorescence de la protéine GFP. Les photographies ont été obtenues grâce au système d'imagerie confocale de Zeiss LSM 510 avec un objectif 63X/1,4 à immersion. La barre représente $10\mu\text{m}$.

B: Maturation artificielle de CFTR-F508del obtenue après 24h de culture à 26°C en présence de glycérol (10%) et en absence ou en présence de $10\mu\text{M}$ d' AlF_4^- . La même quantité de protéine ($70\mu\text{g}$) a été déposée par puits, séparée sur gel d'acrylamide à 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose puis révélée par immunodétection en utilisant l'anti-CFTR (L12B4) et le kit ECL.

L'ensemble des données obtenu avec l' AlF_4^- montre que CFTR-F508del est dégradée par une voie qui est dépendante du GTP, faisant intervenir une protéine G hétérotrimérique et probablement localisée au niveau du RE.

V/ Localisation de la dégradation dépendante du GTP de CFTR-F508del

A ce stade de nos résultats, nous avons montré que la déplétion en GTP et le traitement par l' AlF_4^- ralentissent la dégradation de CFTR-F508del. Cette inhibition ne semble pas passer par un effet sur le trafic vésiculaire. Cependant, la localisation exacte où la protéine CFTR-F508del est dégradée par cette voie GTP-dépendante restait à élucider. Ainsi nous avons entrepris la caractérisation du compartiment où a lieu cette dégradation.

A. Effet de différents inhibiteurs du trafic vésiculaire

Récemment, un certain nombre de travaux ont suggéré l'existence d'un compartiment juxtaposant le RE et qui pourrait être le lieu de dégradation de protéines transmembranaires (Fu et Sztul, 2003). Pour cela, ces protéines doivent subir un transport vésiculaire vers ce compartiment. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé trois inhibiteurs du transport rétrograde (**noc** ; **nocodazole**), du transport antérograde (**H89** ; inhibiteur de la PKA et donc de la phosphorylation) ou de la formation des vésicules COPII à partir du RE (**brefeldine A** ; **BFA**) (Figure R37).

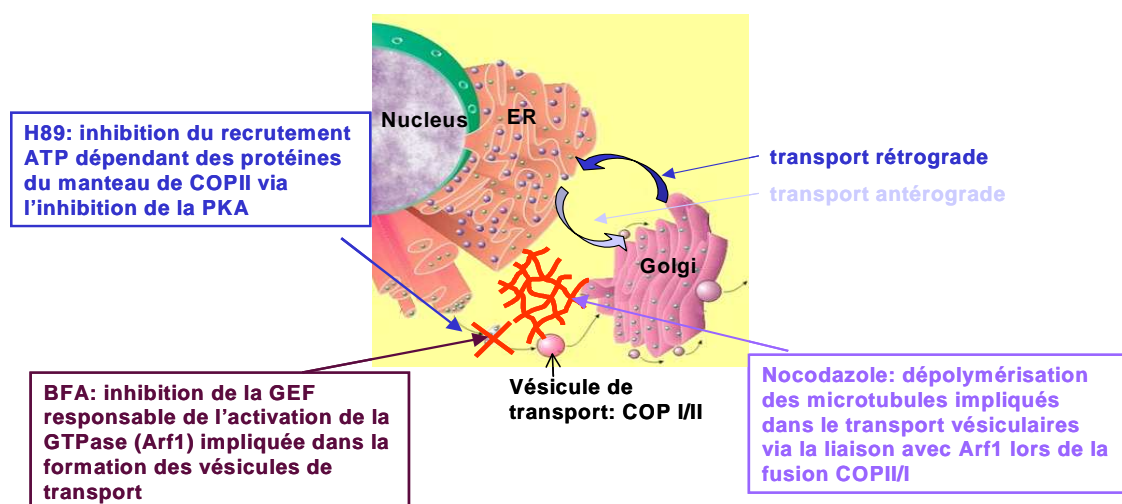


Figure R37: Schéma montrant les différents sites d'action des trois inhibiteurs (nocodazole, H89 et BFA) utilisés dans notre étude.

Nous avons testé l'effet de ces inhibiteurs en présence de CHX seule ou additionnée de 50µM de MPA (déplétion en GTP) ou de 10µM d'AIF₄⁻.

Dans le cas du MPA, les résultats résumés sur la figure R38 montrent, qu'en absence de cette molécule, ces inhibiteurs n'ont aucun effet sur la vitesse de dégradation de CFTR-F508del (T_{1/2} ~35 min). La présence du MPA restaure la stabilité de CFTR-F508del (T_{1/2} ~180 min). Ces résultats suggèrent que l'inhibition des voies de transport vésiculaire n'affecte pas la vitesse de dégradation de CFTR-F508del.

De la même manière, nous avons aussi montré que l'effet de l'AIF₄⁻ n'est pas aboli en présence de H89, BFA et nocodazole (Figure R38).

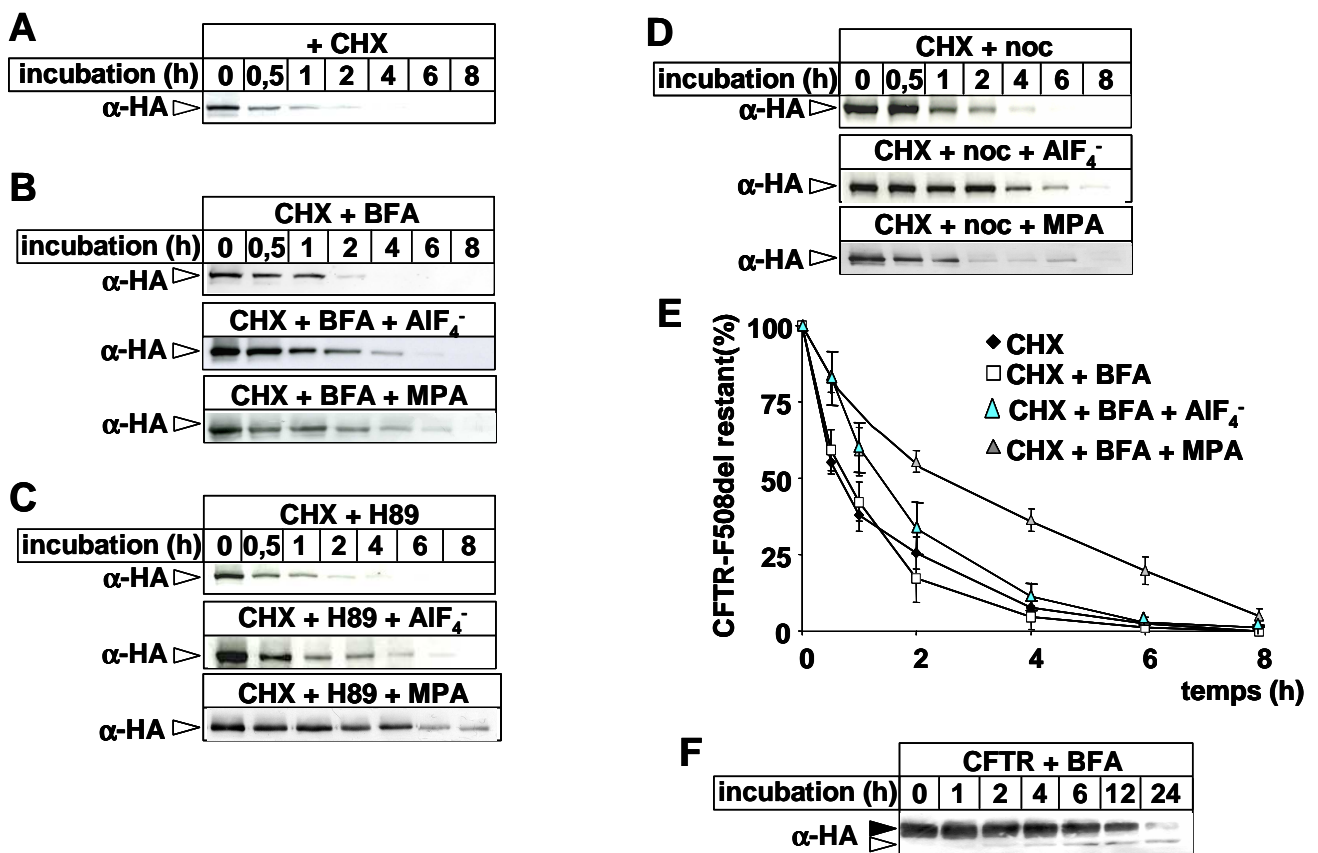


Figure R38: Effet des inhibiteurs du transport vésiculaire sur la stabilité de CFTR-F508del.

La stabilité, *in vivo*, de CFTR-F508del stablement transfectée dans les cellules BHK-21 a été étudiée en présence de CHX (100µg/mL) seule (A) ou en présence de BFA (5µg/mL), de H89 (50µM) ou de nocodazole (noc, 10µM). Les mêmes conditions ont été utilisées pour étudier l'effet de 50µM de MPA (B, C, D) et de 10µM d'AIF₄⁻ (B, C, D). La même quantité de protéine (70 µg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature, et la flèche pleine, la forme mature.

E: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne ± S.E. (n=3).

F: Disparition de la forme mature de la protéine CFTR sauvage au profit de la forme immature observé en présence de 5µg/ml de BFA.

Par ailleurs, afin de s'assurer que l'effet de la BFA est bien présent dans notre système d'expression, nous avons cherché à reproduire l'effet de cette molécule sur l'apparition de la forme immature et la disparition de la forme mature de la protéine CFTR sauvage (Lukacs *et al.*, 1994). Les résultats indiqués sur la **figure R38 F** montrent, qu'au bout de 24 h de traitement avec la BFA, la protéine de CFTR sauvage est principalement exprimée sous sa forme immature (**Figure R38 F**).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats renforce l'idée que le RE est le lieu de dégradation de CFTR-F508del.

B. Dégradation de CFTR-F508del dans des cellules perméabilisées

Une autre manière de montrer à la fois que la dégradation de CFTR-F508del, dépendante du GTP, est bien localisée dans le RE et insensible aux protéines cytoplasmiques est l'utilisation de cellules perméabilisées. Ce modèle qui permet de dialyser le cytoplasme a souvent été utilisé pour étudier le trafic des compartiments intracellulaires ainsi que la dégradation de certaines protéines (Bernier *et al.*, 1994).

1- Caractérisation de la perméabilisation

Avant d'utiliser ce système, nous avons, dans un premier temps, procédé à sa caractérisation. La perméabilisation a été obtenue par l'utilisation de la digitonine (50µg/mL) en présence d'un tampon approprié (**voir Matériels et Méthodes**). Pour évaluer l'efficacité de ce détergent dans la perforation de la membrane plasmique des cellules BHK-21, nous avons effectué un dosage enzymatique de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), enzyme localisée principalement dans le cytoplasme (Botion *et al.*, 2001). Pour cela, après 10min de perméabilisation à 4°C, nous avons récupéré le cytoplasme. Dans ce compartiment, l'activité spécifique (AS) de la LDH est enrichie de 12 fois par rapport aux cellules perméabilisées (**Figure R39**). Ceci montre que l'utilisation de la digitonine permet de correctement dialyser le cytoplasme.

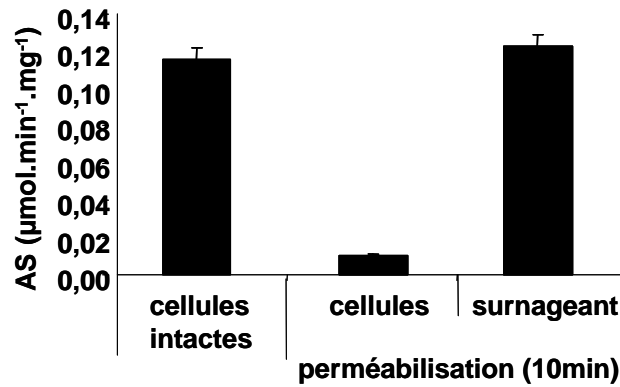


Figure R39: Détermination de l'activité spécifique (AS) de la LDH.

L'AS correspond à l'activité enzymatique (AE) rapportée au mg de protéine. L'AE a été mesurée soit dans les cellules intactes, soit dans les cellules perméabilisées et dans le surnageant obtenu après perméabilisation. La perméabilisation a été réalisée en présence de la digitonine (50μg/mL) pendant 10min à 4°C.

2- Effet de l'AIF₄⁻ sur la dégradation de CFTR-F508del

Une fois le système de cellules perméabilisées caractérisé, nous l'avons utilisé pour étudier la dégradation de CFTR-F508del en présence de CHX seule ou additionnée de 10μM d'AIF₄⁻. Les résultats obtenus montrent clairement qu'en absence de cytoplasme, l'AIF₄⁻ continue d'inhiber la dégradation de CFTR-F508del (**Figure R40**). Ces résultats montrent aussi que les protéines cytoplasmiques n'influencent pas l'activité protéolytique dépendante du GTP, inhibée par l'AIF₄⁻ et localisée au niveau du RE.

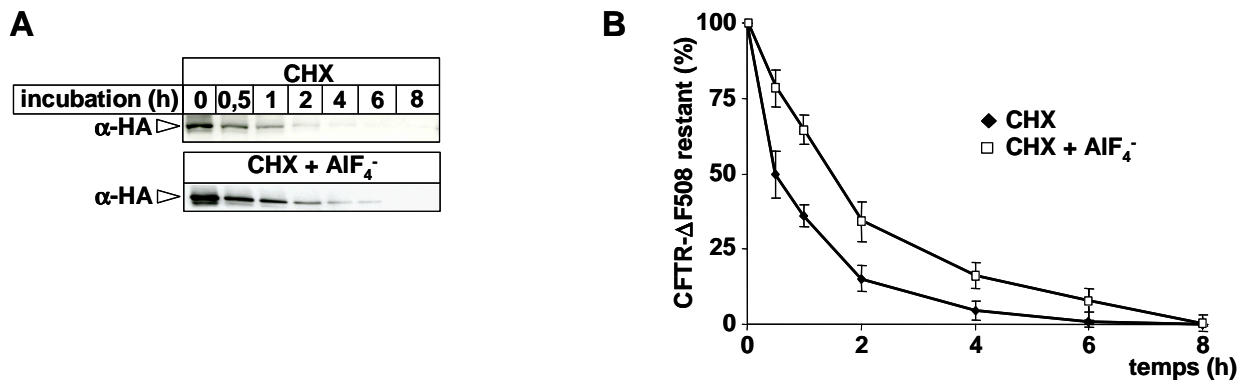


Figure R40: Dégradation de CFTR-F508del dans les cellules perméabilisées.

A: La dégradation de CFTR-F508del a été suivie dans les cellules perméabilisées à la digitonine (50μg/mL) en présence de CHX (100μg/mL) seule ou additionnée de 10μM d'AIF₄⁻. La même quantité de protéine (70 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature

B: Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne ± S.E. (n=4).

C. Inhibition de la retranslocation de CFTR-F508del

Le scénario avancé jusqu'à aujourd'hui pour expliquer la dégradation de CFTR-F508del implique sa retranslocation vers le cytoplasme *via* le translocon Sec61, pour finalement être dégradée au niveau du cytoplasme sous sa forme ubiquitinylée (Bebök *et al.*, 1998, Sato *et al.*, 1998). Cependant, aucune preuve directe n'a été apportée pour étayer cette hypothèse.

Dans notre étude, nous ne pouvons pas exclure que la déplétion en GTP ou le traitement par l' AlF_4^- affecte les événements de retranslocation et par conséquent inhibe la dégradation de CFTR-F508del. Pour vérifier ces possibilités, nous avons essayé de bloquer la retranslocation, dans notre système d'expression hétérologue, en utilisant le diamide (**Dia**). Il s'agit d'un réactif sulfhydryle qui oxyde les ponts disulfures et par conséquent inhibe l'activité liée à ce pont disulfure dans les protéines.

Le traitement par le diamide (1mM) en présence de CHX (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) n'affecte pas la dégradation de CFTR-F508del, alors que sa présence combinée avec l' AlF_4^- l'inhibe (**Figure R41 A**). Ces résultats suggèrent que, soit le translocon Sec61 n'est pas impliqué dans la retranslocation vers le cytoplasme de CFTR-F508del, soit que cette dernière n'est pas transloquée et par conséquent qu'elle est dégradée au niveau du RE.

Pour apporter la preuve de l'efficacité du diamide comme inhibiteur de la retranslocation dans notre système d'expression, nous avons suivi la dégradation d'une protéine modèle, la sous unité alpha du récepteur T ($\text{TCR}\alpha$), en absence et en présence du diamide. $\text{TCR}\alpha$ est une protéine incorrectement assemblée retenue au niveau du RE et dégradée par la voie ubiquitine/protéasome après retranslocation vers le cytoplasme *via* le translocon Sec61 (Yu *et al.*, 1997, Tortorella *et al.*, 1998). Pour cela, les cellules BHK-21, exprimant de façon stable la protéine $\text{TCR}\alpha$ décorée par l'étiquette HA, ont été traitées par la CHX seule ou combinée avec 1mM de diamide. Comme montré précédemment (Tortorella *et al.*, 1998), le diamide ralentit la disparition du $\text{TCR}\alpha$ (**Figure R41 B**) confirmant son effet dans notre système d'expression.

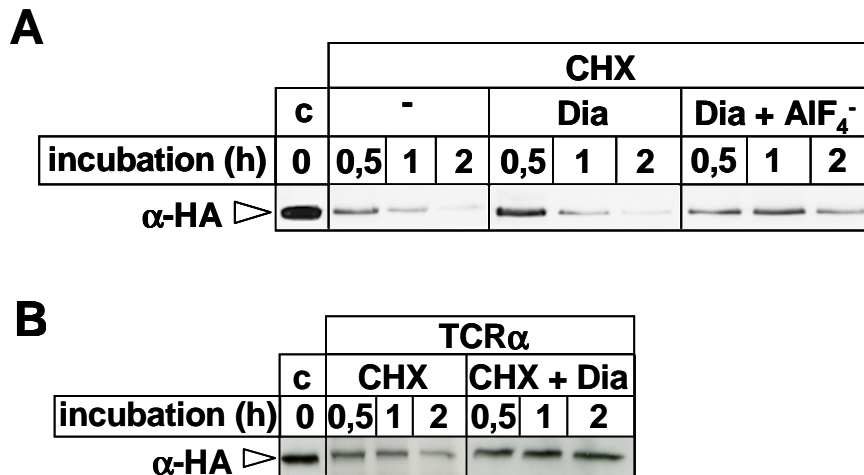


Figure R41: Profil de dégradation des protéines CFTR-F508del et TCRα en présence de diamide, inhibiteur de la retranslocation.

La disparition, *in vivo*, de CFTR-F508del (A) et de TCRα (B) a été suivie en présence de CHX (100 µg/mL) seule ou combinée avec 1mM de diamide (Dia) ± 10µM d'AlF₄⁻.

La même quantité de protéine (70 µg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7-12%, électrotransférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme immature pour CFTR mutée et la forme RE de TCRα.

Ces expériences nous ont permis de déterminer que la protéine CFTR-F508del reste séquestrée dans le RE avant d'être dégradée puisqu'elle n'est ni transportée dans un autre compartiment via des vésicules ni transloquée dans le cytoplasme.

VI/ Rôles des protéines associées à la membrane du RE dans la voie de dégradation GTP-dépendante

La voie de dégradation GTP-dépendante est bien localisée au niveau du RE. Dans ce compartiment, nous trouvons à côté des protéines transmembranaires, des protéines périphériques cytoplasmiques et reticulaires. Afin d'évaluer le rôle de ces différentes protéines dans le processus de dégradation, nous avons utilisé la FRE pour étudier la disparition de CFTR-F508del avant et après traitement par le Na₂CO₃ (0,1M) à pH 11,5.

A. Effet des protéines périphériques du RE sur la dégradation de CFTR-F508del

Nous avons voulu, dans un premier temps, vérifier que la FRE correspond bien au RE. En effet, pour évaluer la pureté de notre fraction, nous nous sommes basés uniquement sur le dosage enzymatique avec tous les facteurs de contamination qu'il peut présenter. Pour s'assurer de la pureté de la FRE, et surtout de l'origine des protéines qui peuvent potentiellement être impliquées dans la voie de dégradation GTP-dépendante, nous avons généré une lignée cellulaire exprimant à la fois la protéine CFTR-F508del et la protéine calréticuline (protéine résidente du RE) fusionnée, au niveau de sa partie C-terminale, à la protéine fluorescente de *Discosoma sp.* (*Discosoma sp.* Red fluorescent protein ; DsRed) qui elle-même est fusionnée au niveau de sa partie C-terminale à la séquence de rétention du RE, KDEL. Ces cellules, après deux semaines de sélection au G418, ont été triées par cytométrie en flux (**voir Matériels et Méthodes**) basée sur l'utilisation de l'autofluorescence de la DsRed (λ_{ex} =558nm et λ_{em} =583nm). Ceci nous a permis de sélectionner les cellules positives par rapport aux cellules négatives à la fluorescence (**Figure R42 A**). Les fractions obtenues par gradient de sucrose à partir de cette lignée cellulaire ont été testées pour leur autofluorescence dans un spectrofluorimètre. Les résultats, indiqués sur la **figure R42 B**, montrent que les fractions enrichies en RE correspondent bien à celles caractérisées par dosage enzymatique (**Figure R42 B**). Cette nouvelle méthode nous a permis de confirmer que la FRE, que nous avons utilisé pour monter la localisation réticulaire de la voie de dégradation GTP-dépendante, ne contient que du RE.

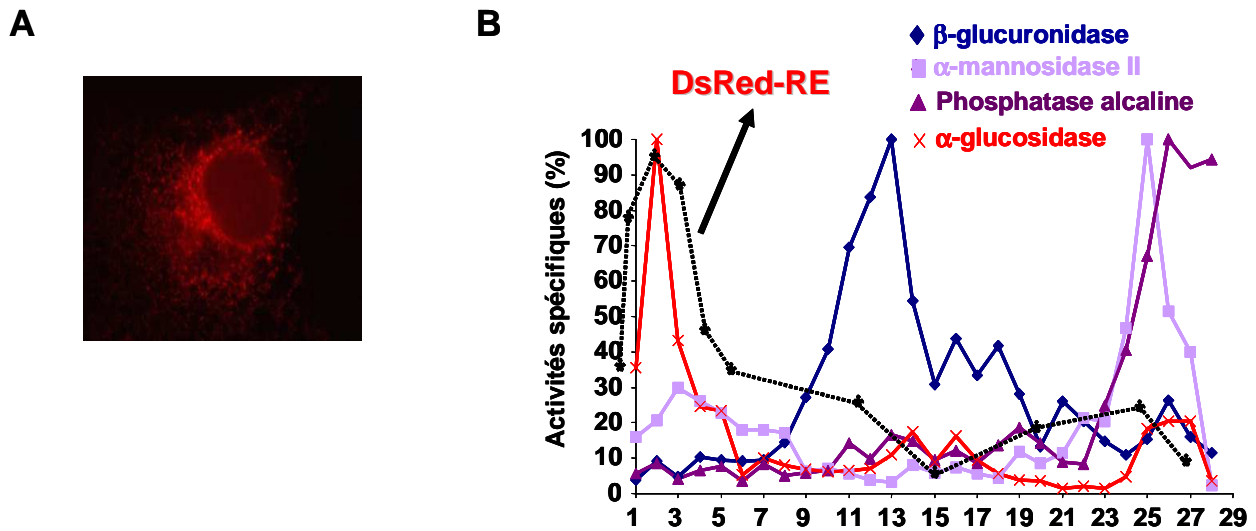


Figure R42: Localisation cellulaire et distribution de la protéine DsRed-RE le long du gradient de sucrose.

A: La protéine DsRed-RE est exprimée de manière stable dans les cellules BHK-21. Son expression et sa localisation ont été vérifiées par l'auto-fluorescence de la DsRed. Elle est confinée dans le RE.

B: Détermination de l'auto-fluorescence de la DsRed dans les différentes fractions obtenues après séparation des organelles sur gradient de sucrose discontinu.

Par la suite, nous avons utilisé cette fraction pour étudier la dégradation de CFTR-F508del. Pour s'affranchir des protéines périphériques, nous avons, au préalable, traité la FRE par le Na_2CO_3 (0,1M), pH 11,5. Les résultats obtenus sur la fraction non traitée, indiqués sur la **figure R43**, confirment que la protéine CFTR-F508del est dégradée au niveau du RE. Cette dégradation est inhibée par l' AlF_4^- . Par contre le traitement par le Na_2CO_3 abolit cette dégradation ainsi que l'effet de l' AlF_4^- (**Figure R43**). Ces résultats suggèrent que les protéines périphériques seraient impliquées dans le système de dégradation GTP-dépendant.

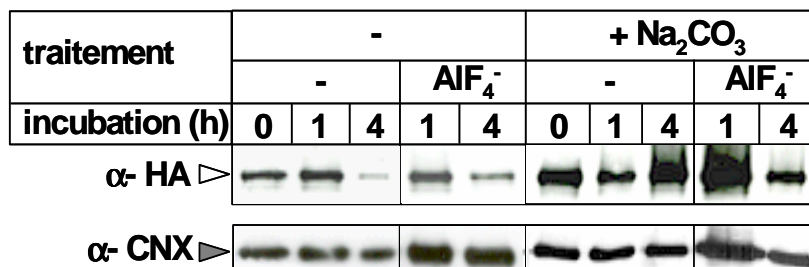


Figure R43: Rôles des protéines périphériques du RE dans la dégradation de CFTR-F508del.

La FRE, obtenue par fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose à partir de cellules BHK-CFTR-F508del, a été incubée à 37°C dans un tampon de dégradation ne contenant pas d'ATP avant et après traitement avec 0,1M Na_2CO_3 , pH 11,5. Ces incubations ont été réalisées en absence ou en présence de 10 μM d' AlF_4^- . La même quantité de protéines (50 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel d'acrylamide à 7%, puis électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL. La calnexine (CNX) a été détectée en utilisant l'anti-CNX.

B. Les protéines périphériques sont porteuses d'une activité GTPasique

Le fait que la dégradation réticulaire de CFTR-F508del, inhibée par l' AlF_4^- , ne peut avoir lieu qu'en présence des protéines périphériques, implique que ces protéines doivent être porteuses d'une activité GTPasique. Ainsi, nous avons cherché à savoir si les protéines périphériques préparées à partir de la FRE possédaient une activité GTPasique, et surtout si cette activité était sensible à l' AlF_4^- . Pour cela, nous avons utilisé un système couplé (NADH/NAD^+) pour mesurer par spectrophotométrie l'activité GTPasique dans la FRE et dans la fraction correspondant aux protéines périphériques obtenue après traitement par le Na_2CO_3 . Le **tableau RIV** résume les résultats obtenus. Ainsi dans la FRE intacte (FRE), nous détectons une activité GTPasique assez importante et inhibée à plus de 60 % en présence de $10\mu\text{M}$ d' AlF_4^- , alors que le traitement préalable de cette fraction soit par le KI (250 mM), soit par le Na_2CO_3 (0,1M, pH 11,5), fait disparaître cette activité (**Tableau RIV A**). Cette activité est aussi sensible à la présence d' AlF_4^- . Par contre dans les fractions de protéines périphériques correspondantes (PP KI et PP Na_2CO_3), nous trouvons la majorité de cette activité après un traitement avec le KI (**Tableau RIV**).

L'ensemble de ces résultats confirme la présence d'une voie de dégradation dépendante du GTP au niveau du RE. Cette voie semble être constituée principalement de protéines périphériques.

Tableaux RIV: Détermination de l'activité GTPasique.

$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	+ 5mM GTP	+ $10\mu\text{M AlF}_4^-$
FRE	0,29	0,11
FRE + Na_2CO_3	0,004	0,004
PP Na_2CO_3	0,09	0,002
PP KI	0,29	0,007

La FRE a été utilisée pour mesurer l'activité GTPasique avant et après traitement par deux agents chaotropiques, l'iodure de potassium (KI, 250mM) ou Na_2CO_3 (0,1M, pH 11,5), et en présence de GTP (5mM) ou de $10\mu\text{M}$ d' AlF_4^- . Les protéines périphériques du RE isolées par traitement des microsomes par des agents chaotropiques sont testées pour leur activité GTPasique. Les valeurs indiquées dans le tableau représentent l'AS ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$).

VII/ La voie GTP-dépendante localisée au niveau du RE n'est pas spécifique

La protéine CFTR-F508del, localisée au niveau du RE, est dégradée par une voie qui dépend du GTP. Nous avons montré que cette voie est exclusivement localisée au niveau du RE et principalement portée par ces protéines périphériques. Cependant, nous n'avons pas de données sur le degré de spécificité de cette voie vis-à-vis de CFTR-F508del. Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'étudier le profil de dégradation d'une autre protéine qui est aussi retenue dans le RE lorsqu'elle est incorrectement assemblée. Il s'agit de la sous-unité α du récepteur T (TCR α). Nous avons, dans un premier temps, généré une lignée cellulaire BHK-21 exprimant de façon stable le TCR α étiqueté par l'étiquette HA. Comme pour le CFTR-F508del, nous avons regardé l'effet de l' AIF_4^- et de la déplétion en GTP, en présence de MPA sur la dégradation de TCR α . Les résultats de la **Figure R44 A, B** montrent d'abord que cette protéine est dégradée rapidement en présence de CHX seule ($T_{1/2} \sim 35$ min). Ces résultats sont comparables à ceux trouvés avec la méthode du marquage métabolique (pulse-chase) (Yu *et al.*, 1997). L'incubation avec la lactacystine ralentit cette dégradation ($T_{1/2} \sim 90$ min) confirmant que TCR α est un substrat de la voie ubiquitine/protéasome (Yu *et al.*, 1997) au même titre que la protéine CFTR-F508del ; et comme cette dernière, la déplétion en GTP (MPA, 50 μM) ou le traitement par l' AIF_4^- (10 μM) ralentit sa dégradation (**Figure R44 A, B**).

Ces résultats apportent la confirmation que la voie de dégradation GTP-dépendante identifiée au niveau du RE n'est pas spécifique de CFTR-F508del.

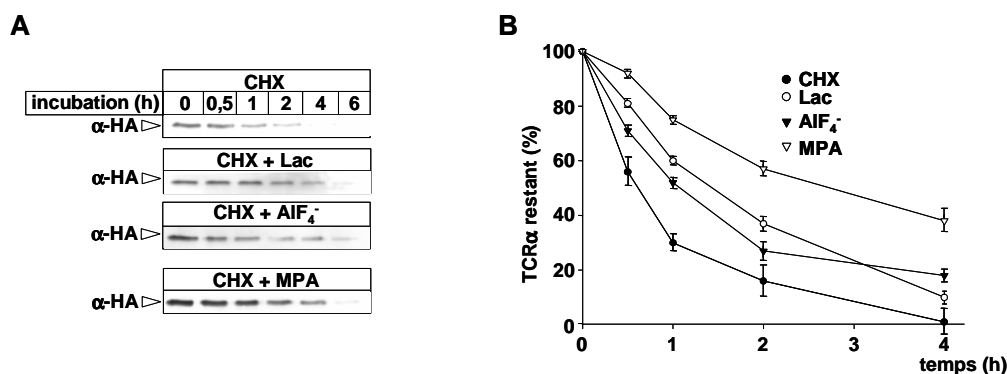


Figure R44 : Effet de la déplétion en GTP sur la dégradation de la protéine TCR α

La stabilité, *in vivo*, de TCR α (décorée par l'étiquette HA), exprimée de façon stable dans les cellules BHK-21, a été étudiée en présence de CHX (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**A**) seule ou en présence soit de la lactacystine (Lac, 10 μM), d' AIF_4^- (10 μM) ou d'acide mycophénolique (MPA, 50 μM). La même quantité de protéine (70 μg) a été déposée par puits, séparée sur gel de 7%, électro-transférée sur membrane de nitrocellulose et révélée par immunodétection, en utilisant l'anticorps anti-HA et le kit ECL. La flèche vide indique la forme RE de la protéine TCR α .

B: Quantité de TCR α restante exprimée en pourcentage par rapport à sa valeur initiale à $t=0$ en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme SCION. Moyenne \pm S.E. ($n=4$).

VIII/ Identification des protéines GTP-dépendantes

Nous avons montré qu'au niveau du RE, le nucléotide GTP joue un rôle très important dans l'élimination rapide de CFTR-F508del. Nous avons caractérisé ce mécanisme protéolytique. Nous avons montré qu'il est localisé dans le RE, inhibé par la déplétion en GTP, inhibé par l' AlF_4^- et assuré par des protéines périphériques à activités GTPasiques. Le profil d'inhibition par l' AlF_4^- suggère qu'il s'agit de GTPases de type G_α . Nous avons utilisé différentes méthodes pour identifier ces protéines, mais sans réussite. Seule la spectrométrie de masse, pratiquée sur des échantillons protéiques obtenus soit à partir de FRE soit à partir de protéines périphériques obtenues après traitement alcalin (Na_2CO_3 , pH 11,5), nous a permis d'identifier deux protéines GTPasiques de la famille des protéines G_α (Tableau RV, les protéines d'intérêt sont en violet). L'identification de ces protéines périphériques GTP-dépendantes a été réalisée par spectrométrie de masse en collaboration avec le laboratoire de Jérôme Garin (Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes, CEA-Grenoble).

Dans le **tableau RV**, nous avons reporté les protéines identifiées avec un grand score. Nous constatons que l'ensemble des protéines fait parti du RE ou est associé à ce compartiment. Ceci confirme la qualité de notre préparation et encore une fois supporte l'ensemble de nos résultats. Nous avons aussi pu identifier la présence de deux GTPases de la famille Ras et surtout deux GTPases de la famille G_α : $G_{\alpha12}$ et $G_{\alpha13}$.

Ces résultats associés à ceux de l'activité GTPasiques supportent la présence de protéines GTP-dépendantes qui peuvent être impliquées dans la dégradation de CFTR-F508del et de $\text{TCR}\alpha$ au niveau du RE.

Tableau RV: Les protéines indiquées dans ce tableau ont été identifiées avec un grand score

Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse

*40S ribosomal protein S2 (Fragment)

6 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5630400A09

*84 kDa heat shock protein

Actin cytoplasmic 2

*ADP/ATP translocase 2 (Adenine nucleotide translocator 2) (ANT 2)

*Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II) (Calpactin I heavy chain) (Chromobindin-8) (p36)

*Calnexin precursor

*Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1)

*Elongation factor 2 (EF-2)
*Endoplasmic precursor (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (94 kDa glucose-regulated protein)
*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (GAPDH)
*GRP78
Guanine nucleotide binding protein alpha 13
Guanine nucleotide binding protein alpha 12
*Histone 2b protein (OTTMUSP00000000551) (Histone protein Hist1h2bb)
Histone H4
RAB7
Ras-related protein Rap-1A precursor (Ras-related protein Krev-1)
Ribosomal protein L32
Rpl13 protein
Rpl23a protein
Sodium/potassium transporting ATPase alpha1 chain precursor
Spliceosome RNA helicase Bat1
T complex protein 1 subunit delta
T complex protein 1 subunit eta
Translocon-associated protein alpha subunit precursor (TRAP-alpha) (Signal sequence receptor)
Tubulin alpha-1 chain (Alpha-tubulin 1) (Alpha-tubulin I)
Ubiquitin
Vimentin
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1) (mVDAC1) (mVDAC5)

Plusieurs protéines caractéristiques du compartiment ont été identifiées témoignant de la qualité de la préparation des microsomes enrichie en RE (indiquées par *).

Conclusion

L'ensemble de nos résultats montre d'abord que l'activité du protéasome qui est ATP- et lactacystine-dépendante n'est pas corrélée avec la dégradation de CFTR-F508del au niveau du RE.

Nous avons aussi montré qu'à côté de la voie ubiquitine/protéasome, il existe une voie qui est ATP-indépendante et GTP-dépendante. Cette voie qui est inhibée par l' AlF_4^- et insensible à l' AlF_3 fait appel à des protéines GTPases de type $G\alpha$ associées au RE.

Conclusions & Perspectives

Les protéines membranaires et les protéines sécrétées nouvellement synthétisées doivent atteindre leur conformation native avant de pouvoir quitter le RE. Les mécanismes de contrôle de qualité associés au RE font que toutes les protéines improprement repliées, fonctionnellement défectueuses ou qui ne peuvent pas s'assembler en complexe multimérique sont retenues, puis dirigées vers la voie de dégradation associée au RE appelé ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) (Brodsky et McCracken, 1999 ; Bonifacino et Weissman, 1998). Cette dernière implique la reconnaissance, la translocation et la protéolyse des protéines défectueuses par le protéasome, complexe enzymatique multicatalytique, localisé au niveau du cytoplasme (Brodsky et McCracken, 1999). Cependant, la dégradation des protéines membranaires par le protéasome représente un défi compte tenu de la localisation différente de ce dernier (cytoplasme) et de ces différents substrats (RE). S'il est bien établi que la décoration par l'ubiquitine, signal nécessaire à la dégradation par le protéasome, se fait au niveau du RE, rien n'est évident quand au rôle du protéasome cytoplasmique dans ce processus. En effet, l'ensemble des études montrant l'implication du protéasome cytoplasmique dans la dégradation des protéines incorrectement repliées est basé sur l'utilisation d'inhibiteurs soit de la retranslocation soit de l'activité protéasomale et surtout sur l'apparition dans le cytoplasme d'agrégats après une inhibition prolongée du protéasome (Johnston *et al.*, 1998).

La protéine CFTR-F508del a été parmi les premières protéines incorrectement repliées pour lesquelles le protéasome a été impliqué (Ward *et al.*, 1995 ; Jensen *et al.*, 1995). La dégradation de CFTR-F508del requière l'interaction avec les chaperonnes, l'ubiquitination, un translocon Sec61 fonctionnel et un protéasome correctement assemblé (Kopito, 1999). Alors que la voie ubiquitine/protéasome associée à l'ERAD semble être la principale voie responsable de la dégradation de CFTR-F508del, l'implication d'autres systèmes protéolytiques dans ce processus n'est pas à exclure (Ward *et al.*, 1995 ; Jensen *et al.*, 1995). Une série d'observations suggère que la dégradation de CFTR-F508del est un processus impliquant de multiples systèmes protéolytiques (Lukacs *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1995 ; Jensen *et al.*, 1995). Cependant, la nature des protéases impliquées dans la dégradation de CFTR-F508del, ainsi que le lieu de leur action, restent inconnus.

Au travers des résultats obtenus au cours de mon doctorat, nous avons approfondi les rôles de l'ATP et du protéasome dans la dégradation de CFTR-F508del, et nous avons montré la participation de voie dépendante du GTP dans ce processus.

Dans notre étude, nous avons utilisé la ligné BHK-21 stablement transfectée par la protéine CFTR-F508del. L'expression de CFTR sauvage ou de CFTR-F508del dans cette lignée a été déjà bien caractérisée (Haardt *et al.*, 1999). Devant la faible spécificité des anticorps anti-CFTR, même monoclonaux, la protéine CFTR a été décorée par l'étiquette HA. Ceci a énormément facilité sa détection, soit à l'échelle cellulaire (immunofluorescence), soit au niveau d'extraits protéiques (immunodétection). La présence de l'étiquette HA, au niveau de la partie C-terminale de CFTR, ne modifie ni son expression, ni son adressage, ni sa stabilité membranaire, ni sa fonction canal chlorure (Cl⁻) (Haardt *et al.*, 1999). Une fois que nous avons reçu ces cellules, nous avons aussi vérifié, d'une part qu'elles ne présentaient pas de contamination aux mycoplasmes, et d'autre part que la localisation cellulaire, le profil de glycosylation et la présence des deux formes caractéristiques de CFTR (forme immature/core-glycosylée et forme mature/complexe-glycosylée) sont préservés. Ceci a été montré à la fois par l'utilisation des anticorps anti-HA et anti-CFTR (L12B4 et M3A7).

Pour étudier la dégradation de CFTR-F508del, il fallait s'affranchir de la problématique du niveau d'expression. D'une manière générale, la surexpression d'une protéine incorrectement repliée est à l'origine de l'apparition au niveau cytoplasmique d'agrégats protéiques (Kopito, 2000), et surtout est responsable de l'induction de la réponse UPR (Schröder, 2006). Pour CFTR-F508del, il a été montré que sa surexpression dans des cellules de l'épithélium respiratoire, induit l'apparition du courant Cl⁻ dépendant de l'AMPc, secondaire à une fuite depuis le RE vers la membrane plasmique (Cheng *et al.*, 1995). Dans notre système, le niveau d'expression, révélé par immunodétection, est comparable à celui détectée dans les cellules où la protéine CFTR-F508del est exprimée de manière endogène (Sharma *et al.*, 2004). De plus, nous n'avons détecté ni la présence de la forme mature, ni un courant Cl⁻ dépendant de l'AMPc. Les résultats de la co-immunolocalisation ont confirmé ces observations et surtout ont montré que la protéine CFTR-F508del est bien confinée dans le RE. La localisation réticulaire a aussi été observée dans d'autres lignées cellulaires (CHO, HEK et COS) transfectées stablement par CFTR-F508del (Lukacs *et al.*, 1994 ; Ward et Kopito, 1994 ; Jensen *et al.*, 1995).

L'utilisation prolongée (> 8h) des inhibiteurs du protéasome, pour caractériser la dégradation des protéines incorrectement repliées, s'accompagne souvent de la formation d'une structure multiprotéique au niveau du cytoplasme désignée sous le nom d'aggresome (Kopito, 2000). Cette dernière apparaît lorsque la capacité du protéasome est supplantée par la production de protéines incorrectement repliées (Wigley *et al.*, 1999). Ce phénomène a aussi

été décrit dans le cas de certaines maladies neurodégénératives (Dimakopoulos, 2005). Dans le cas de la protéine CFTR-F508del-GFP, cette structure a été observée après 16h de traitement par l'ALLN ou la lactacystine, inhibiteurs du protéasome (Johnston *et al.*, 1998).

Dans notre étude, nous avons réussi à nous soustraire à ce processus par l'utilisation de la cycloheximide (CHX). En inhibant la synthèse protéique, la CHX bloque la transformation des protéines nouvellement synthétisées en substrat de dégradation. Ceci permet de suivre le devenir d'une population déjà existante sans altérer sa vitesse de dégradation, et surtout d'empêcher la formation d'aggresome en présence des inhibiteurs du protéasome. Nous avons aussi montré, par l'utilisation de la CHX, que les protéines à courte demi-vie ne participent pas à la dégradation de CFTR-F508del.

En utilisant cette méthode, nous avons montré que des inhibiteurs du protéasome comme la lactacystine, réputée être spécifique et irréversible (Fenteany *et al.*, 1994), ne sont pas capables de stabiliser la protéine CFTR-F508del au delà de 4h de traitement. Nos résultats confirment ceux reportés précédemment par Jensen (Jensen *et al.*, 1995) et montrent que nous obtenons la même chose avec l'époxomycine, un autre inhibiteur spécifique du protéasome (Gelman *et al.*, 2002). L'utilisation de 200µM de lactacystine donne le même résultat, ce qui exclut une possible dégradation de cette dernière à 37°C. Des résultats similaires ont été obtenus en présence de clasto-Lactacystine β-lactone (βLac), inhibiteur spécifique et direct du protéasome 20S. Cette molécule résulte de la transformation, dans la cellule, de son précurseur, la lactacystine (Fenteany *et al.*, 1994). Ces résultats excluent donc la possibilité que l'effet limité dans le temps de l'inhibition du protéasome résulterait d'une transformation incomplète de la lactacystine. Une autre possibilité est que la lactacystine ne soit pas irréversible et surtout qu'elle ne soit pas spécifique du protéasome. En effet, les premières études ont décrit un effet complet et irréversible de la lactacystine obtenu sur des fractions du protéasome 20S purifiées et reconstituées *in vitro* (Fenteany *et al.*, 1994, Bogyo *et al.*, 1997). Cependant, récemment, un certain nombre d'études montrent que cet inhibiteur, ainsi que d'autres, ne sont pas totalement spécifiques des activités protéolytiques du protéasome (Rogers et Dean, 2003).

C'est pour cette raison que nous avons entrepris l'étude, *in vivo*, des activités protéolytiques caractéristiques du protéasome, en présence de lactacystine, et surtout essayé de corréliser ces activités à la disparition rapide de CFTR-F508del. Il ressort que, même après 16h de traitement avec la lactacystine, il subsiste une activité résiduelle (~20%) que nous avons désigné sous le nom d'activité résiduelle lactacystine indépendantes (ARLI). Cette activité pourrait expliquer la disparition continue de CFTR-F508del et constituer une

preuve pour l'absence de spécificité de la lactacystine vis-à-vis du protéasome (Rogers et Dean, 2003). Le recouvrement de l'activité du protéasome après 6h de traitement avec la lactacystine appuie ces résultats et confirme, par la même occasion, pour la première fois, l'effet irréversible *in vivo* de cette molécule. Ces résultats sont conformes avec les études montrant que la lactacystine n'inhibe que ~80% de l'activité du protéasome aussi bien dans des extraits cellulaires que dans du protéasome immunoprécipité (Grune *et al.*, 1995).

Nous avons aussi montré que la dégradation de CFTR-F508del est insensible aux inhibiteurs de l'activité lysosomale, ce qui exclut un effet indirect de la lactacystine sur la cathepsine A, enzyme lysosomale (Ostrowska *et al.*, 1997). Ces résultats sont en accord avec ce qui a été reporté précédemment (Cheng *et al.*, 1990; Lukacs *et al.*, 1994).

L'ARLI (~20%) serait-elle suffisante pour dégrader complètement la protéine CFTR-F508del? D'après Oberdorf (Oberdorf *et al.*, 2001), *in vitro*, il faudrait inhiber ~ 93% de l'activité protéasomale pour arriver à inhiber complètement la dégradation de CFTR-F508del. Le plus étonnant est que l'ARLI est détectée grâce à l'utilisation de substrats fluorescents, supposés spécifiques des trois principales activités protéasomales, soulevant la possibilité que l'ARLI puisse représenter soit une activité protéasomale partiellement inhibée par la lactacystine (du fait que cet inhibiteur n'est pas spécifique du protéasome (Rogers et Dean, 2003 ; Oberdorf *et al.*, 2001)), soit une activité protéolytique lactacystine-indépendante, mais partageant des caractéristiques communes avec le protéasome.

Etant donné que l'activité protéolytique et l'assemblage du protéasome sont dépendants de l'ATP (Orino *et al.*, 1991), la déplétion cellulaire de ce dernier nous a permis de discriminer entre ces deux possibilités. La perte de ~99% de l'ATP cellulaire n'est pas capable d'inhiber la dégradation de CFTR-F508del. Au contraire, elle accentue sa dégradation. Dans la mesure où l'ATP joue un rôle important dans le repliement global de CFTR-F508del (Lukacs *et al.*, 1994 ; Du *et al.*, 2005), nous pouvons légitimement supposer que ce résultat est la conséquence d'une agrégation. Cependant, l'utilisation de la CHX qui permet de suivre un pool de protéines définitivement repliées, exclut cette possibilité. Ceci a été aussi confirmé par l'absence de la forme agrégée dans la fraction insoluble, en présence de CHX, après 30 min et 90 min de déplétion en ATP. La déplétion en ATP pourrait aussi influencer les interactions entre les chaperonnes et les protéines substrats comme CFTR-F508del (Oberdorf *et al.*, 2005) et, par conséquent, ralentir leur dégradation. Cependant, ceci n'est pas le cas dans nos conditions. En effet, la déplétion en ATP est censée réduire considérablement l'activité ATPasique des protéines chaperonnes, et par conséquent augmenter le temps d'interaction, ce qui ralentit la dégradation des protéines substrats. La

présence d'une dégradation ATP-indépendante a été rapportée pour CFTR-F508del (Lukacs *et al.*, 1994) et récemment décrite aussi pour la protéine p21 (Xiaotao *et al.*, 2007).

En utilisant les mêmes conditions, nous avons aussi montré que l'activité protéasomale n'est pas complètement inhibée, et ceci malgré une concentration d'ATP ~0,5% au bout de 90min de déplétion. Ces essais révèlent la présence d'une activité résiduelle ATP-indépendante (15-20%). Des activités protéasomales ATP-indépendantes ont aussi récemment été décrites (Fukui *et al.*, 2002 ; Reed *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2006). Cette activité confirme la présence d'une voie protéolytique différente du protéasome, mais partageant des caractéristiques communes avec celui-ci. Cette activité protéolytique est ATP- et lactacystine-indépendante.

Nous avons par la suite entrepris la caractérisation de cette activité et son rôle dans la dégradation de CFTR-F508del.

Dans un premier temps, nous avons décidé de nous affranchir du milieu cellulaire qui pourrait être source d'interférence pour l'analyse de nos résultats, en étudiant cette activité au niveau microsomal. Ce choix est basé sur le fait que CFTR-F508del a été localisée principalement au niveau du RE dans la lignée BHK-21 utilisée (Sharma *et al.*, 2001). La même localisation a été décrite précédemment dans d'autres lignées cellulaires (Cheng *et al.*, 1990, Kreda *et al.*, 2005). Cependant, d'autres études ont montré que cette protéine avait une localisation, autre que le RE, pouvant être nécessaire pour sa dégradation (Cheng *et al.*, 1995; Kartner *et al.*, 1992 ; Steagall et Drumm, 1999 ; Fu et Sztul, 2003). Pour tenir compte de ces deux possibilités, nous avons donc étudié la dégradation de CFTR-F508del et l'implication de l'activité ATP- et lactacystine-indépendante dans deux types de préparations microsomales. La fraction microsomale (FM), préparée par centrifugation différentielle, nous permet d'obtenir une préparation contenant en plus du RE, les lysosomes, le Golgi, la membrane plasmique ainsi que d'autres types d'endosomes. Et la fraction microsomale riche en RE (FRE) est obtenue par fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose et est enrichie à ~80% en RE d'après la caractérisation enzymatique de chaque fraction.

Tout d'abord, nous avons été surpris de voir que dans les deux préparations (FM et FRE), nous détectons une activité protéolytique en utilisant des substrats spécifiques du protéasome. Cette activité représente ~30% de l'activité totale mesurée dans les cellules intactes. Plus étonnant, cette activité est mesurée dans un tampon sans ATP. Le faible taux en ATP (~4,2%) mesuré dans les deux fractions ne peut pas à lui seul expliquer cette activité. La

même activité a été décrite précédemment dans d'autres préparations microsomales (Wojcik et DeMartino, 2003 ; Hori *et al.*, 1999). De plus, cette activité est inhibée par la β Lac, inhibiteur spécifique du protéasome (Rogers et Dean, 2003), avec une différence de sensibilité entre FM et FRE. Cependant cette inhibition n'excède pas les 45 %. Ceci implique que les deux préparations, au même titre que les cellules intactes, sont porteuses d'une activité ATP- et β Lac-indépendante. Par contre, le traitement de la FM par le Na_2CO_3 n'inhibe que $\sim 30\%$ d'activité du protéasome, suggérant qu'une partie de ce dernier n'est que faiblement associé aux membranes de la FM et/ou que les substrats peptidiques utilisés pour les mesures d'activité sont hydrolysés par des protéases intégrées aux membranes. La première possibilité est à exclure parce que dans le surnageant, et non dans le culot de la FM traitée par le Na_2CO_3 , nous immunodétections la sous-unité α_3 du protéasome 20S. Mais, de manière surprenante, l'inhibition de l'activité protéolytique du protéasome par la β Lac au niveau de la FM traitée est plus importante que celle de la FM intacte ($\sim 70\%$ d'inhibition). Nous pouvons donc penser que l'élimination de protéines périphériques par le Na_2CO_3 (Fujiki *et al.*, 1982) démasque des sites protéolytiques sensibles à la β Lac.

Dans ces fractions, FM et FRE, nous avons détecté la présence de la protéine CFTR-F508del. Cette dernière présente le même profil de dégradation qui n'est pas influencé par la température. En effet, à 26°C , l'ensemble des systèmes protéolytiques tourne au ralenti (Song *et al.*, 2003) ; ceci permet de vérifier que la dégradation n'est pas inhérente à la température. De même, cette dégradation n'est pas la conséquence d'une altération de la qualité de nos préparations microsomales (FM et FRE). En effet, les deux préparations présentent une protéine CFTR-F508del complètement insérée dans la membrane, glycosylée et correctement orientée. Ceci permet de définir, pour la première fois, la FM et la FME comme modèle d'étude pour la dégradation de CFTR-F508del.

Cependant, cette dégradation est observée dans un milieu sans ATP qui, lorsqu'il est présent dans le milieu seul ou avec un système de régénération, ralentit plutôt l'élimination de CFTR-F508del. Ces résultats confirment ceux obtenus avec les cellules intactes au cours d'une déplétion en ATP (Figure R9 ; Lukacs *et al.*, 1994). Or, récemment, Oberdorf *et al.* ont montré, *in vitro*, que l'ATP est important pour la dégradation de CFTR, à 37°C (Oberdorf *et al.*, 2001). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que ce groupe utilise le système de synthèse *in vitro* de CFTR, qui a besoin d'ATP pour fonctionner comme milieu de mesure de la dégradation, alors que dans le notre, nous nous sommes affranchis de l'ensemble des contaminants. De plus, les mêmes résultats ont été obtenus sur les deux types de préparations

confirmant l'absence du rôle d'ATP dans la dégradation de CFTR-F508del. Par contre, nous avons le même profil d'inhibition que le groupe de Skach (Oberdorf *et al.*, 2001), sauf pour l'hémine et la β Lac. En effet sur nos deux préparations (FM et FRE), l'hémine affecte faiblement la dégradation de CFTR-F508del alors que la β Lac présente l'effet le plus probant. Cette différence peut s'expliquer par les préparations microsomales utilisées.

Pour asseoir nos résultats, nous avons aussi montré, avant et après traitement par le Na_2CO_3 , que l'ensemble des ingrédients nécessaire à la reconnaissance et à la dégradation de CFTR-F508del (ubiquitine, BiP calnexine, Hsp70, Hsp90 et la sous-unité $\alpha 3$ du protéasome 20S), est présent, d'une manière intégrale ou associée à la membrane, dans nos fractions FM et FRE. Ces résultats confirment, par la même occasion, que les deux fractions sont principalement riches en RE, et appuient l'idée que la dégradation de CFTR-F508del a lieu exclusivement dans ce compartiment. Les résultats de la dégradation de la protéine CFTR-F508del en présence de différentes quantités de protéines cytosoliques renforcent cette conclusion et montrent que la dégradation a principalement lieu au niveau du RE, dans lequel nous observons une accumulation de CFTR-F508del, après traitement des cellules par la lactacystine, alors qu'elle n'est pas présente dans la fraction cytoplasmique

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus avec les fractions FM et FRE montrent clairement que la protéine CFTR-F508del est exprimée et localisée au niveau du RE. En utilisant des substrats fluorescents pour caractériser l'activité protéasomale, nous avons observé que cette protéine est dégradée à la fois par une voie protéolytique inhibée par les inhibiteurs du protéasome et par une voie insensible à ces inhibiteurs. De plus les deux voies sont actives en absence d'ATP. Ceci montre qu'à ce niveau, le RE, l'activité protéolytique du protéasome n'est pas corrélée à son activité ATPasique et suggère que d'autres voies ATP-et/ou lactacystine-indépendantes participent à l'élimination rapide de CFTR-F508del.

Dans un deuxième temps et en partant de ce constat, nous avons cherché à caractériser la nature de cette voie et son rôle dans l'élimination de CFTR-F508del.

Devant l'impact croissant du GTP dans de nombreux processus cellulaires (Pall, 1985), nous avons décidé d'explorer son rôle dans la voie protéolytique. L'acide mycophénolique (MPA), agent immunodépresseur (Dagher, 2000), nous a permis de dépléter

les cellules spécifiquement en GTP sans toxicité apparente. Pour la première fois, nous avons montré que la déplétion en GTP ralentit considérablement la dégradation de CFTR-F508del ($T_{1/2}$ ~180 min). La guanine abolit cet effet et confirme le rôle important du GTP dans ce processus. Cet effet n'affecte ni l'activité de la voie ubiquitine-protéasome, principalement ATP-dépendante (Orino *et al.*, 1991), ni la stabilité de l'ARNm de CFTR-F508del.

L'implication du GTP dans la stabilisation du core-glycosylé de CFTR sauvage au niveau du RE a été récemment suggérée (Yoo *et al.*, 2002). La surexpression de Sar1-GTP(H79G), un mutant constitutivement actif, stabilise la forme B de CFTR sauvage et diminue sa dégradation de trois à six fois. Au contraire, la surexpression de Sar1-GTP(H79G) ne stabilise pas CFTR-F508del (Yoo *et al.*, 2002).

Le rôle du GTP dans la dégradation de CFTR-F508del a été confirmé avec l' AlF_4^- , dont la présence a ralenti la dégradation de CFTR-F508del ($T_{1/2}$ ~90 min). Cette molécule a la capacité de se comporter comme un analogue du phosphate en position γ et donc de mimer l'effet du GTP (Wittinghoffer, 1997). Cependant, nous avons constaté que son effet est 50% moins efficace que le MPA. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l' AlF_4^- en se liant au GDP, fixé à la protéine G pendant la phase de transition, forme un complexe très difficilement hydrolysable (Combeau et Carlier, 1988). L' AlF_4^- , en occupant le γ -phosphate, empêche la fixation du GTP et/ou de l'ATP sur des protéines cibles. Différentes hypothèses peuvent alors être envisagées pour expliquer l'effet de l' AlF_4^- :

La première est que l' AlF_4^- inhibe la voie ubiquitine/protéasome. Or ni l'activité protéolytique du 20S ni l'ubiquitination totale ne sont inhibées par l' AlF_4^- .

La deuxième s'appuie sur le fait que le GTP puisse se lier à d'autres protéines qui contrôlent le devenir de CFTR. Parmi celles-ci nous trouvons les protéines de choc thermique (Hsp70, Hsp60 et Hsp90) connues pour posséder des domaines de liaison des nucléotides fixant principalement l'ATP et secondairement le GTP (Liberek *et al.*, 1991). L'interaction de ces protéines avec CFTR, en présence de GTP, peut être nécessaire pour induire un changement de conformation. Ces chaperonnes peuvent aussi séquestrer CFTR-F508del et la diriger vers la voie de dégradation. Cette hypothèse est soutenue par le fait que CFTR sauvage et CFTR-F508del se lient à Hsp70 (Yang *et al.*, 1993) et à la calnexine (Pind *et al.*, 1994). Dans ce dernier modèle, le GTP peut être nécessaire pour libérer CFTR-F508del du complexe et permettre sa dégradation. Mais les tests de co-immunoprécipitation montrent que l'interaction CFTR-F508del-chaperonnes n'est affectée ni par l' AlF_4^- ni par le MPA.

La troisième est la liaison du GTP au niveau des NBDs de CFTR. Le GTP peut se lier aux NBDs dont l'affinité est élevée pour l'ATP (Anderson *et al.*, 1991 ; Anderson et Welsh, 1992). La liaison à l'un et/ou à l'autre domaine peut aider à l'obtention de la forme structurellement résistante à la dégradation. Cependant, les résultats de liaison à l'ATP et au GTP, suivie de l'élution soit par l'ATP/GTP soit par l' AlF_4^- discréditent cette hypothèse.

Une quatrième hypothèse est que la protéine CFTR-F508del est dégradée dans un compartiment autre que le RE. En effet, l' AlF_4^- est un puissant inhibiteur de l'export vésiculaire (Roa *et al.*, 1993). Cet effet passe principalement par les protéines G associées aux vésicules golgiennes (Roa *et al.*, 1993 ; Presley *et al.*, 1997). Dans notre système d'expression hétérologue, en utilisant la protéine chimère VSVG-GFP, aucun effet de l' AlF_4^- sur l'adressage du RE vers le Golgi n'a été observé. Ceci montre que notre système d'expression n'est pas différent des autres systèmes utilisés (Hirschberg *et al.*, 1998) pour étudier l'adressage des protéines. L'effet de l' AlF_4^- sur la dégradation n'est donc pas le résultat de l'inhibition du transport vésiculaire entre le RE et le Golgi. De plus, l' AlF_4^- ne perturbe pas la maturation artificielle de CFTR-F508del à 26°C en présence de glycérol. Ces résultats sont en accord avec les données récentes montrant que les dominants négatif Arf1 et Rab1a/Rab2 GTPases, toutes bloquant le trafic conventionnel du RE vers le Golgi, ne sont pas capables d'inhiber le trafic de CFTR sauvage (Yoo *et al.*, 2002).

Récemment, il a été montré que la dégradation de CFTR-F508del pourrait se dérouler au niveau d'un compartiment intermédiaire sensible au nocodazole (Fu et Sztul, 2003 ; Kamhi-Nesher *et al.*, 2001). Cependant, l'ensemble des résultats obtenus avec l' AlF_4^- tend à montrer que la dégradation GTP-dépendante de CFTR-F508del a lieu dans le RE. Pour étayer cette observation, nous avons conduit une série d'expériences dont nous avons tiré plusieurs conclusions.

Premièrement, la dégradation de CFTR-F508del est insensible aux inhibiteurs des lysosomes et des cystéine-protéases (Lukacs *et al.*, 2004 ; Stratford *et al.*, 2003).

Deuxièmement, la dégradation est ralentie en présence d' AlF_4^- et des inhibiteurs du transport vésiculaire (BFA, H89 et nocodazole), alors que leurs présences seules n'affectent pas ce processus.

Troisièmement, l'effet de l' AlF_4^- a été observé au niveau des cellules perméabilisées. Ces dernières nous ont aussi permis de vérifier que les protéines cytoplasmiques n'influencent pas la dégradation de CFTR-F508del, d'une manière comparable à celle observée dans les fractions FM et FRE.

Finalement, nous avons aussi exclu la possibilité que CFTR-F508del soit retransloquée vers le cytoplasme avant d'être dégradée. En effet, l'utilisation d'inhibiteur de ce processus, comme le diamide, montre que la dégradation dépendante du GTP de la protéine CFTR-F508del est exclusivement réticulaire, contrairement à ce qui a été suggéré pour la voie ubiquitine/protéasome (Bebök *et al.*, 1998 ; Gelman *et al.*, 2002).

La forme AlF_4^- n'existe pas dans la nature. Elle résulte d'un mélange, en solution, de NaF et d' AlCl_3 . L' AlF_4^- est présent simultanément sous forme ionique dans le milieu. Il est en équilibre, et sa concentration dépend des concentrations totales de fluor, d'aluminium et du pH (Martin, 1988). A pH 7,2, le complexe AlF_4^- est majoritaire par rapport à AlF_3 (Liang, 2003). Dans le milieu nous trouvons aussi du NaF et de l' AlCl_3 . Testées séparément, ces molécules n'affectent pas la dégradation de CFTR-F508del. Il en est de même pour l' AlF_3 . Ce dernier résultat nous permet de discriminer d'une manière préliminaire entre les deux familles de protéines G qui pourraient être impliquées dans cette voie de dégradation. En effet, l' AlF_4^- est bien connu pour interagir seulement avec les sous-unités α des protéines G (Kahn, 1991), alors que l' AlF_3 serait spécifique des GTPases monomériques comme Ras ou Rab par exemple (Wittinghofer, 1997). Ces résultats suggèrent que la cible de l' AlF_4^- est une protéine G hétérotrimérique.

De la même manière qu'avec la lactacystine, la déplétion en GTP n'induit pas la maturation de CFTR-F508del et ne permet pas sa stabilisation dans le temps. Ces résultats peuvent s'expliquer par les 18% de GTP persistant après 8 heures de traitement avec le MPA. La présence continue du GTP dans le milieu pourrait s'expliquer par sa production par une source complémentaire comme la voie du P1,P4-bis(5'-guanosyl)-tétraphosphatase qui utilise le P1,P4-bis(5'-guanosyl)-tétraphosphate comme substrat pour produire du GTP et du GMP (Dagher, 2004). Nous pouvons aussi penser que les protéines G, dont l'activité GTPasique intrinsèque est faible (Bourne *et al.*, 1991), complexées au GTP constituent un micro-réservoir pour ce dernier (Bustelo *et al.*, 2007). La dégradation de CFTR-F508del dans les cellules perméabilisées et dans les microsomes enrichis en RE supporte cette dernière hypothèse.

Finalement, cette voie de dégradation dépendante du GTP n'est pas spécifique de CFTR-F508del. En effet nos résultats montrent que la sous-unité α du récepteur T ($\text{TCR}\alpha$) est

aussi dégradée par cette voie. TCR α , comme CFTR-F508del, est une protéine rapidement dégradée lorsqu'elle est mal assemblée (Stafford et Bonifacino, 1991). C'est aussi une protéine substrat du protéasome dégradée au niveau du cytosol (Yu *et al.*, 1997 ; Fiebiger *et al.*, 2004). Ces données confirment que la voie GTP-dépendante agit en parallèle et/ou en complémentarité de la voie ubiquitine/protéasome. L'avantage de cette voie est qu'elle est localisée au niveau du RE et ne nécessite donc pas de retranslocation.

L'ensemble de nos résultats montre que le RE est le lieu de la voie de dégradation GTP-dépendante. Dans ce compartiment, nous trouvons des protéines transmembranaires et des protéines associées à la membrane. Les tests d'activité GTPasiques réalisés sur les deux fractions (protéines périphériques et/ou transmembranaires) obtenues après traitement par le Na₂CO₃ de la FRE montrent la présence d'activités GTPasique sensible à l'AlF₄⁻ dans la fraction de protéines périphériques. Ceci n'est pas étonnant dans la mesure où de nombreuses études ont décrit la présence de protéines G dans le RE (Shan et Walter, 2005 ; Sato, 2004).

L'hypothèse que différentes voies protéolytiques participent à la dégradation, au niveau du RE, des protéines incorrectement repliées ou mal assemblées est toujours d'actualité (Wolf et Kopan, 2004 ; Schmitz et al., 2004 ; Qui et al., 2004). Nos résultats apportent de nouveaux arguments quand à l'existence d'autres voies protéolytiques et montrent, pour la première fois, que le GTP via les protéines G, probablement les protéines G hétérotrimériques, est impliqué dans la dégradation des protéines incorrectement repliées au niveau du réticulum endoplasmique. Il reste à déterminer s'il s'agit d'une protéase GTP-dépendante et/ou d'une voie de protéolyse régulée par les protéines G.

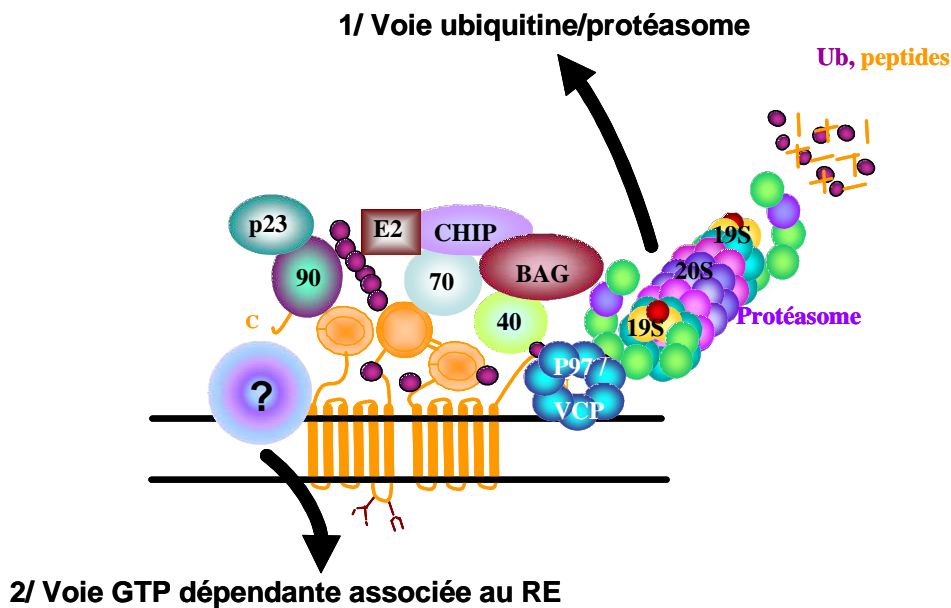


Figure : Voies impliquées dans la dégradation de CFTR-F508del au niveau du RE.

90, 70, 40 : Hsp, « Heat shock protein », protéine inductible par un stress thermique,
 BAG : « Bcl-2-associated Anti-death Gene »,
 CHIP : « C-terminus of Hsc70 Interacting Protein », protéine se fixant au C-terminal de Hsc70.
 E2 : « ubiquitine conjugating enzyme »
 Ub : ubiquitine

Perspectives :

Durant plus d'un an, nous avons essayé, en utilisant différentes méthodes (co-immunoprécipitation, purification sur colonne de GTP, électrophorèse 2D), d'identifier la ou les protéines incriminées sans résultat concluant.

Nous avons, par la suite, choisi une autre stratégie, qui consiste à identifier, par spectrométrie de masse, l'ensemble des protéines présentes dans la fraction FRE, protéines périphériques et protéines transmembranaires. Ceci nous a permis d'identifier deux protéines candidates appartenant à la familles des protéines G α : G α 12 et G α 13.

Les protéines G₁₂/G₁₃ participent à de multiples fonctions cellulaires. Ainsi, à côté de leurs rôles dans l'activation de la protéine Rho, *via* son activateur RhoGEF (Hart *et al.*, 1998), elles participent aussi à la régulation de l'activité du cytosquelette et de la croissance cellulaire (Kosaza *et al.*, 1989). Plus intéressant, ces protéines ont été récemment décrites comme capables de moduler des réactions cellulaires par le biais d'interaction avec d'autres protéines membranaires ou cytoplasmiques. Ainsi, ces deux protéines co-immunoprécipitent avec la protéine AKAP (A-kinase anchoring protein) qui est capable, en se liant à la sous-unité régulatrice II de la PKA, d'influencer sa localisation cellulaire (Kurose, 2003). D'autres

protéines interagissent aussi avec $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ comme les protéines Btk (Bruton's tyrosine kinase), rasGAP, PYK2, RhoGEF, Radixin (ERM family protein), protéine phosphatase de type 5, cadhérine et finalement la protéine Hsp90 (Kurose, 2003). L'interaction de la $G\alpha_{12}$, et non de la $G\alpha_{13}$, avec la protéine chaperonne Hsp90, responsable, en outre, de la dégradation des protéines CFTR sauvage et mutée (Wang *et al.*, 2006), influence l'organisation intracellulaire de l'actine (Vaiskunaite *et al.*, 2001). Cependant, le mécanisme de régulation reste encore mal connu. Cette interaction clé avec un partenaire important, Hsp90, du contrôle de qualité et de la dégradation des protéines incorrectement repliées, comme CFTR-F508del, au niveau du RE, laisse penser que les protéines de la famille $G\alpha_{12/13}$ seraient partenaires d'un système de dégradation dépendent du GTP.

A cours et à long terme, ce projet visera à caractériser les rôles de ces protéines dans la dégradation du CFTR-F508del.

*Références
Bibliographiques*

A

- Ahmadian M.R., Mittal R., Hall A., Wittinghofer A. (1997). Aluminium fluoride associates with the small guanine nucleotide binding proteins. *FEBS Letters* **408**: 315-318.
- Ahner A., Brodsky J.L. (2004). Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol.* **14(9)**: 474-8.
- Akabas M.H., Kaufmann C., Cook T.A., Archdeacon P. (1994). Amino acid residues lining the chloride channel of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **269(21)**: 14865-8.
- Akabas M.H., Cheung M., Guinamard R. (1997). Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**: 453-463.
- Akabas M.H. (2000). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel *J. Biol. Chem.* **275(6)**: 3729-32.
- Alberti S., Demand J., Esser C., Emmerich N., Schild H., Hohfeld J. (2002). Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J Biol Chem.* **277(48)**: 45920-7.
- Alberti S., Böhse K., Arndt V., Schmitz A., Höhfeld 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**: 4003-4010.
- Aleksandrov L., Aleksandrov A.A., Chang X.B., Riordan J.R. (2002). The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *J. Biol. Chem.* **277(18)**: 15419-25.
- Allin C., Ahmadian M.R., Wittinghofer A., Gerwert K. (2001). Monitoring the GAP catalyzed H-Ras GTPase reaction at atomic resolution in real time. *Proc Natl Acad Sci USA* **98(14)**: 7754-7759.
- Amenta J.S., Brocher S.C. (1980). Role of lysosomes in protein turnover: catch-up proteolysis after release from NH₄Cl inhibition. *J Cell Physiol.* **102(2)**: 259-66.
- Amshoff C., Jack H.M., Haas I.G. (1999). Cycloheximide, a new tool to dissect specific steps in ER-associated degradation of different substrates. *J. Biol. Chem.* **380(6)**: 669-77.
- Andersen D.H. (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. *Am. J. Dis. Child.* **56**: 344-399.
- Anderson M.P., Berger H.A., Rich D.P., Gregory R.J., Smith A.E., Welsh M.J. (1991). Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell.* **67(4)**: 775-84.
- Anderson M.P., Gregory R.J., Thompson S., Souza D.W., Paul S., Mulligan R.C., Smith A.E., Welsh M.J. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science.* **253(5016)**: 202-5.
- Anderson M.P., Welsh M.J. (1992). Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains. *Science.* **257(5077)**: 1701-1704.

Andreeva A.V., Vaiskunaite R., Kutuzov M.A., Profirovic J., Skidgel R.A., Voyno-Yasenetskaya T. (2006). Novel mechanisms of G protein-dependent regulation of endothelial nitric-oxide synthase. *Mol Pharmacol.* **69(3)**: 975-82.

Aridor M., Bannykh S.I., Rowe T., Balch W.E. (1995). Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol.* **131(4)**: 875-93.

Aridor M., Balch W.E. (1999). Integration of endoplasmic reticulum signal in health and disease. *Nat. Med.* **5**: 745-751.

Armstrong J., Patel S., Riddle P. (1990). Lysosomal sorting mutants of coronavirus E1 protein, a Golgi membrane protein. *J Cell Sci.* **95**: 191-197.

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.

B

Bai C., Biwersi J., Verkman A.S., Matthay M.A. (1999). A mouse model to test the in vivo efficacy of chemical chaperones. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* **40**: 39-45.

Banales J.M., Prieto J., Medina J.F. (2006). Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World J. Gastroenterol.* **12(22)**: 3496-3511.

Bannykh S.I., Bannykh G.I., Fish K.N., Moyer B.D., Riordan J.R., Balch W.E. (2000). Traffic pattern of cystic fibrosis transmembrane regulator through the early exocytic pathway. *Traffic.* **1(11)**: 852-70.

Basso C., Vergani P., Nairn A.C., Gadsby D.C. (2003). Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH₂-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *J. Gen. Physiol.* **122(3)**: 333-48.

Bays N.W., Hampton R.Y. (2002). Cdc48-Ufd1-Npl4: stuck in the middle with Ub. *Curr Biol.* **12(10)**: R366-71.

Bear C.E., Duguay F., Naismith A.L., Kartner N., Hanrahan J.W., Riordan J.R. (1991). Cl⁻ channel activity in *Xenopus* oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J Biol Chem.* **266(29)**: 19142-5.

Bebök Z., Mazzochi C., King S.A., Hong J.S., Sorscher E.J. (1998). The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61 β and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J. Biol. Chem.* **273(45)**: 29873-29878.

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 Letters.* **327(3)**: 337-42.

Becq F., Jensen T.J., Chang X.B., Savoia A., Rommens J.M., Tsui L.C., Buchwald M., Riordan J.R., Hanrahan J.W. (1994). Phosphatase inhibitors activate normal and defective CFTR chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91(19)**: 9160-4.

Benharouga M., Haardt M., Kartner N., Lukacs G.L. (2001). COOH-terminal Truncations Promote Proteasome-dependent Degradation of Mature Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator from Post-Golgi Compartments. *J. Cell. Biol.* **153**: 957-970.

- Benharouga M., Sharma M., So J., Haardt M., Popov M., Schwapach B., Grinstein S., Du K., Lukacs G.L. (2003). The role of the C terminus and Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor in the functional expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in nonpolarized cells and epithelia. *J. Biol. Chem.* **278(24)**: 22079-22089.
- Berdiev B.K., Prat A.G., Cantiello H.F., Ausiello D.A., Fuller C.M., Jovov B., Benos D.J., Ismailov I.I. (1996). Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments. *J Biol Chem.* **271(30)**: 17704-10.
- Berger H.A., Welsh M.J. (1991). Electrolyte transport in the lungs. *Hosp Pract (Off Ed)* **26(3)**: 53-9.
- Berger A.L., Ikuma M., Welsh M.J. (2005). Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second-nucleotide binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102(2)**: 455-460.
- Bergeron J.J., Zapun A., Ou W.J., Hemming R., Parlati F., Cameron P.H., Thomas D.Y. (1998). The role of the lectin calnexin in conformation independent binding to N-linked glycoproteins and quality control. *Adv Exp Med Biol.* **435**: 105-16.
- Bernier M., Liotta A.S., Kole H.K., Shock D.D., Roth J. (1994). Dynamic regulation of intact and C-terminal truncated insulin receptor phosphorylation in permeabilized cells. *Biochemistry.* **33(14)**: 4343-51.
- Bertrand C.A., Frizzell R.A. (2003). The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**: C1-C18.
- Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L.M., Harding H.P., Ron D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* **2(6)**: 326-32.
- Bianchet M.A., Ko Y.H., Amzel L.M., Pedersen P.L. (1997). Modeling of nucleotide binding domains of ABC transporter proteins based on a F1-ATPase/recA topology: structural model of the nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J. Bioenerg. Biomembr.* **29(5)**: 503-24.
- Bilan F., Thoreau V., Nacfer M., Derand R., Norez C., Cantereau A., Garcia M., Becq F., Kitzis A. (2003). Syntaxin 8 impairs trafficking of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and inhibits its channel activity. *J Cell Sci.* **117(Pt 10)**: 1923-35.
- Bogyo M., Gaczynska M., Ploegh H.L. (1997). Proteasome inhibitors and antigen presentation. *Biopolymers.* **43(4)**: 269-80.
- Bonifacino J.S., Weissman A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**: 19-57.
- Botion L.M., Brasier A.R., Tian B., Udupi V., Green A. (2001). Inhibition of proteasome activity blocks the ability of TNF α to down-regulate G proteins and stimulate lipolysis. *Endocrinology* **142(12)**: 5069-5075.
- Boucher R.C., Stutts M.J., Knowles M.R., Cantley L., Gatzky J.T. (1986). Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest.* **78(5)**: 1245-52.
- Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* **349(6305)**: 117-27.

Braakman I., Helenius J., Helenius A. (1992). Role of ATP and disulphide bonds during protein folding in the endoplasmic reticulum. *Nature*. **356(6366)**: 260-2.

Bradbury N.A., Cohn J.A., Venglarik C.J., Bridges R.J. (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 N.A. (1999). Intracellular CFTR: localization and function. *Physiol. Rev.* **79**: S175-S187.

Brezillon S., Zahm J.M., Pierrot D., Gaillard D., Hinnrasky J., Millart H., Klossek J.M., Tümmler B., Puchelle E. (1997). ATP depletion induces a loss of respiratory epithelium fonctionnal integrity and down-regulates CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) expression. *J. Biol. Chem.* **272(44)**: 27830-27838.

Brodsky J.L., McCracken A.A. (1999). ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **10(5)**: 507-13.

Bronsveld I., Mekus F., Bijman J., Ballmann M., Greipel J., Hundrieser J., Halley D.J., Laabs U., Busche R., De Jonge H.R., Tümmler B., Veeze H.J. (2000). Residual chloride secretion in intestinal tissue of deltaF508 homozygous twins and siblings with cystic fibrosis. The European CF Twin and Sibling Study Consortium. *Gastroenterology*. **119(1)**: 32-40.

Buchner J. (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* **10(1)**: 10-9.

Burghardt B., Elkaer M.L., Kwon T.H., Racz G.Z., Varga G., Steward M.C., Nielsen S. (2003). Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut*. **52(7)**: 1008-16.

Bustelo X.R., Sauzeau V., and Berenjano I.M. (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*; **29(4)**: 356-370.

C

Cabral C.M., Choudhury P., Liu Y., Sifers N. (2000). Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways. *J. Biol. Chem.* **275(32)**: 25015-25022.

Cahill P., Nason M.W. Jr, Ambrose C., Yao T.Y., Thomas .P, Egan M.E. (2000). Identification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator domains that are important for interactions with ROMK2. *J Biol Chem*. **275(22)**: 16697-701.

Cantiello H.F. (1996). Role of the actin cytoskeleton in the regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp Physiol*. **81(3)**: 505-14.

Caramelo J.J., Castro O.A., Alonso L.G., De Prat-Gay G., Parodi A.J. (2003). UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100(1)**: 86-91.

Carlson E.J., Pitonzo D., Skach W.R. (2006). p97 functions as an auxiliary factor to facilitate TM domain extraction during CFTR ER-associated degradation. *EMBO J*. **25(19)**: 4557-66.

- Chabot H., Vives M.F., Dagenais A., Grygorczyk C., Berthiaume Y., Grygorczyk R. (1999). Downregulation of epithelial sodium channel (ENaC) by CFTR co-expressed in *Xenopus oocytes* is independent of Cl⁻ conductance. *J. Membr. Biol.* **169(3)**: 175-188.
- Chamberlain L.H., Graham M.E., Kane S., Jackson J.L., Maier V.H., Burgoyne R.D., Gould G.W. (2001). Synaptic vesicle protein, cysteine-string protein, is associated with the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes and interacts with syntaxin 4. *J Cell Sci.* **114(Pt 2)**: 445-55.
- Chan K.W., Csanady L., Seto-Young D., Nairn A.C., Gadsby D.C. (2000). Severed molecules functionally define the boundaries of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's NH(2)-terminal nucleotide binding domain. *J Gen Physiol.* **116(2)**: 163-80.
- Chen E.Y., Bartlett M.C., Clarke D.M. (2000). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator has an altered structure when its maturation is inhibited. *Biochemistry.* **39(13)**: 3797-803.
- Chen E.Y., Bartlett M.C., Loo T.W., Clarke D.M. (2004). The $\Delta F508$ mutation disrupts packing of the transmembrane segments of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **279(38)**: 39620-39627.
- Cheng J., Wang H., Guggino W.B. (2004). Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J. Biol. Chem.* **279(3)**: 1892-1898.
- Cheng S.H., Gregory R.J., Marshall J., Paul S., Souza D.W., White G.A., O'Riordan C.R., Smith A.E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell.* **63(4)**: 827-34.
- Cheung M., Akabas M.H. (1996). Identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel-lining residues in and flanking the M6 membrane-spanning segment. *Biophys. J.* **70(6)**: 2688-95.
- Cheung K.H., Leung C.T., Leung G.P., Wong P.Y. (2003). Synergistic effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and aquaporin-9 in the rat epididymis. *Biol Reprod.* **68(5)**: 1505-10.
- Chevet E., Jakob C.A., Thomas D.Y., Bergeron J.J.M. (1999). Calnexin family members as modulators of genetic diseases. *Cell & Developmental Biology* **10**: 473-480.
- Chevet E., Cameron P.H., Pelletier M.F., Thomas D.Y., Bergeron J.J. (2001). The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Struct Biol.* **11(1)**: 120-4.
- Choi J.Y., Muallem D., Kiselyov K., Lee M.G., Thomas P.J., Muallem S. (2001). Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature.* **410(6824)**: 94-7.
- Choo-Kang L.R., Zeitlin P.L. (2001). Induction of HSP70 promotes $\Delta F508$ CFTR trafficking. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **281**: L58-L68.
- Clabecq A., Henry J.P., Darchen F. (2000). Biochemical characterization of rab3-GTPase-activating Protein reveals a mechanism similar to that of Ras-GAP. *J. Biol. Chem.* **275(41)**: 31786-31791.
- Clancy J.P., Bebek Z., Sorscher E.J. (1997). Purification, characterization, and expression of CFTR nucleotide-binding domains. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29(5)**: 475-82.
- Combeau C., Carlier M.F. (1988). Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F actin using vanadate and the Structural analogs of phosphate BeF₃⁻ and AlF₄⁻. *J. Biol. Chem.* **263**: 17429-17436.

Cormet-Boyaka E., Jablonsky M., Naren A.P., Jackson P.L., Muccio D.D., Kirk K.L. (2004). Rescuing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by transcomplementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101(21)**: 8221-8226.

Cotten J.F., Welsh M.J. (1997). Covalent modification of the regulatory domain irreversibly stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **272(41)**: 25617-22.

Crawford I., Maloney P.C., Zeitlin P.L., Guggino W.B., Hyde S.C., Turley H., Gatter K.C., Harris A., Higgins C.F. (1991). Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88(20)**: 9262-6.

D

Da T., Verkman A.S. (2004). Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45(12)**: 4477-83.

Dagher P.C. (2000). Modeling ischemia in vitro: selective depletion of adenine and guanine nucleotide pools. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **279**: C1270-C1277.

Dagher P.C. (2004) Apoptosis in ischemic renal injury: roles of GTP depletion and p53. *Kidney Int.* **66(2)**: 506-9.

Dahlmann B., Kopp F., Kuehn L., Niedel B., Pfeifer G., Hegerl R. and Baumeister W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. *FEBS Lett.* **251**: 125-131.

Dai R.M., Chen E., Longo D.L., Gorbea C.M., Li C.C. (1998). Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. *J Biol Chem.* **273(6)**: 3562-73.

Dalemans W., Barbry P., Champigny G., Jallat S., Dott K., Dreyer D., Crystal R.G., Pavirani A., Lecocq J.P., Lazdunski M. (1991). Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature.* **354(6354)**: 526-8.

Dawson D.C., Smith S.S., Mansoura M.K. (1999). CFTR : mechanism of anion conduction. *Physiol. Rev.* **79**: S47-S71.

Denning G.M., Ostedgaard L.S., Cheng S.H., Smith A.E., Welsh M.J. (1992). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J Clin Invest.* **89(1)**: 339-49.

Devidas S., Guggino W.B. (1997). CFTR: Domains, Structure and Function. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29(5)**: 443-450.

Di Sant'agnese P., Darling R.C., Perara G.A., Shea E. (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Am J Dis Child.* **86(5)**: 618-9.

Dick T.P., Nussbaum A.K., Deeg M., Heinemeyer W., Groll M., Schirle M., Keilholz W., Stevanovic S., Wolf D.H., Huber R., Rammensee H.G., Schild H. (1998). Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem.* **273(40)**: 25637-46.

Dimakopoulos A.C. (2005). Protein aggregation in Alzheimer's disease and other neuropathological disorders. *Curr Alzheimer Res.* **2(1)**: 19-28.

Donoso G., Herzog V., Schmitz A. (2005). Misfolded BiP is degraded by a proteasome-independent endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Biochem J.* **387**: 897-903.

Dray-Charier N., Paul A., Scoazec J.Y., Veissiere D., Mergey M., Capeau J., Soubrane O., Housset C. (1999). Expression of delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein and related chloride transport properties in the gallbladder epithelium from cystic fibrosis patients. *Hepatology.* **29(6)**: 1624-34.

Du K., Sharma M., Lukacs G.L. (2005). The Δ F508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12(1)**: 17-25.

Dulhanty A.M, Riordan J.R. (1994). Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase causes a conformational change in the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry.* **33(13)**: 4072-9.

E

Edelman A., Fanen P. (2000). CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), une protéine multifonctionnelle. *Biologie et pathologie des épithéliums.* pp 69-80.

Ellgaard L. Helenius A. (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Current Opinion in Cell Biology* **13**: 431-437.

Ellgaard L. Helenius A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* **4**: 181-191.

Escobar-Henriques M., Balguerie A., Monribot C., Boucherie H., Daignan-Fornier B. (2001). Proteome analysis and morphological studies reveal multiple effects of the immunosuppressive drug mycophenolic acid specifically resulting from guanylic nucleotide depletion. *J. Biol. Chem.* **276(49)**: 46237-46242.

Eudes R., Lehn P., Férec C., Mornon J.P., Callebaut I. (2005). Nucleotide binding domains of human CFTR : a structural classification of critical residues and disease-causing mutations. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 2112-2123.

F

Farber S. (1945). Some organic digestive disturbances in early life. *J. Mich. State Med. Soc.* **44**: 587-594.

Farinha C.M., Nogueira P., Mendes P., Penque D., Amaral M.D. (2002). The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required *in vivo* stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem. J.* **366**: 797-806.

Farinha C.M., Amaral M.D. (2005). Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol. Cell. Biol.* **25(12)**: 5242-5252.

Fenteany G., Standeart R.F., Reichard G.A., Corey E.J., Schreiber S.L. (1994). A β -lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3358-3362.

Fiebigler E., Hirsch C., Vyas J.M., Gordon E., Ploegh H.L., Tortorella D. (2004). Dissection of the dislocation pathway for type I membrane proteins with a new small molecule inhibitor, eeyarestatin. *Mol Biol Cell.* **15(4)**: 1635-46.

- Foskett J.K. (1998). CIC and CFTR chloride channel gating. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 689-717.
- Frelet A., Klein M. (2006). Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Letters.* **580**: 1064-1084.
- 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): 157-163.
- Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S., Lazarow P.B. (1982). Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **93**: 97-102.
- Fukui T., Eguchi T., Atomi H., and Imanaka T. (2002) A membrane-bound archaeal Lon protease displays ATP-independent proteolytic activity towards unfolded proteins and ATP-dependent activity for folded proteins *J. Bacteriol.* **184**(13): 3689-98
- Fuller W., Cuthbert A.W. (2000). Post-translational disruption of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-molecular chaperone complex with geldanamycin stabilizes delta F508 CFTR in the rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **275**(48): 37462-8.
- G**
- Gabriel S.E., Clarke L.L., Boucher R.C., Stutts M.J. (1993). CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature.* **363**(6426): 263-8.
- Gadsby D.C., Nairn A.C. (1999). Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol. Rev.* **79**: S78-S107.
- Gadsby D.C., Vergani P., Csanady L. (2006). The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature.* **440**: 477483.
- Ganeshan R., Di A., Nelson D.J., Quick M.W., Kirk K.L. (2003). The interaction between Syntaxin 1A and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel is mechanistically distinct from Syntaxin 1A-SNARE interactions. *J. Biol. Chem.* **278**(5): 2876-2885.
- Gelman M.S., Kannegaard E.S., Kopito R.R. (2002). A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **277**(14): 11700-11714.
- Gentzsch M., Chang X., Cui L., WU Y., Ozols V.V., Choudbury A., Pagano R.E., Riordan J.R. (2004). Endocytic trafficking routes of wild type and Δ F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol. Biol. Cell* **15**: 2684-2696.
- Gething M.J., Sambrook J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature.* **355**(6355): 33-45.
- Gilbert A., Jadot M., Leontieva E., Wattiaux-De Coninck S., Wattiaux R. (1998). Δ F508 CFTR localizes in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in cystic fibrosis cells. *Exp. Cell Research.* **242**: 144-152.
- Glickman M.H., Rubin D.M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V.A., Finley D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell.* **94**(5): 615-23.

Gnann A., Riordan J.R., Wolf D.H. (2004). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation depends on the lectins Htm1p/EDEM and the Cdc48 protein complex in yeast. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 4125-4135.

Gong X., Burbridge S.M., Lewis A.C., Wong P.Y., Linsdell P. (2002). Mechanism of Ionomycin inhibition of the CFTR chloride channel. *Br. J. Pharmacol.* **137(6)**: 928-36.

Gong X. et Linsdell P. (2004). Maximization of the rate of chloride conduction in the CFTR channel pore by ion-ion interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **426(1)**: 78-82.

Gottesman M.M., Ambudkar S.V. (2001). Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33(6)**: 453-457.

Grune T., Reinheckel T., Joshi M., and Davies K.J. (1995) Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J. Biol. Chem.* **270(5)**: 2344-51.

H

Haardt M., Benharouga M., Lechardeur D., Kartner N., Lukacs G.L. (1999). C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J. Biol. Chem.* **274(31)**: 21873-7.

Haggie P.M., Stanton B.A., Verkman A.S. (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.

Hamann S. (2002). Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol.* **215**: 395-431.

Hammond C., Braakman I., Helenius A. (1994). Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91(3)**: 913-7.

Hamosh A., Rosenstein B.J., Cutting G.R. (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.

Hanrahan J.W., Kone Z., Mathews C.J., Luo J., Jia Y., Linsdell P. (1998). Patch-clamp studies of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Methods Enzymol.* **293**: 169-94.

Hartl F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-57.

Harding H.P., Zhang Y., Ron D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**: 271-274.

Hart M.J., Jiang X., Kozasa T., Roscoe W., Singer W.D., Gilman A.G., Sternweis P.C., Bollag G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Gα13. *Science.* **280(5372)**: 2112-4.

Hasegawa H., Skach W., Baker O., Calayag M.C., Lingappa V., Verkman A.S. (1992). A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. *Science* **258(5087)**: 1477-9.

- Haws C.M., Nepomuceno I.B., Krouse M.E., Wakelee H., Law T., Xia Y., Nguyen H., Wine J.J. (1996). Delta F508-CFTR channels: kinetics, activation by forskolin, and potentiation by xanthines. *Am J Physiol.* **270(5 Pt 1)**: C1544-55.
- Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T., Mori K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell.* **10**: 3787-3799.
- Hebert D.N., Foellmer B., Helenius A. (1995). Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell.* **81(3)**: 425-33.
- Hegedus T., Sessler T., Scott R., Thelin W., Bakos E., Varadi A., Szabo K., Homolya L., Milgram S.L., Sarkadi B. (2003). C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* **302(3)**: 454-61.
- Hegedus T., Aleksandrov A., Cui L., Gentzsch M., Chang X., Riordan J.R. (2006). F508del CFTR with two altered RXR motifs escapes from ER quality control but its channel activity is thermally sensitive. *Biochim Biophys Acta.* **1758(5)**: 565-72.
- Heinemann F.S., Ozols J. (1998). Degradation of stearyl-coenzyme A desaturase: endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease. *Mol. Biol. Cell.* **9(12)**: 3445-53.
- Hendrick J.P., Hartl F.U. (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* **62**: 349-84.
- Hershko A., Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425-79.
- Higgins C.F., Linton K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol.* **11(10)**: 918-26.
- Hirschberg K., Miller C.M., Ellenberg J., Presley J.F., Siggia E.D., Phair R.D., Lippincott-Schwartz J. (1998). Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol.* **143(6)**: 1485-503.
- Hoffman L., Rechsteiner M. (1996). Regulatory features of multicatalytic and 26S proteases. *Curr Top Cell Regul.* **34**: 1-32.
- Hori H., Nembai T., Miyata Y., Hayashi T., Ueno K., Koide T. (1999). Isolation and characterization of two 20S proteasomes from the endoplasmic reticulum of rat liver Microsomes. *J. Biochem.* **126**: 722-730;
- Hosokawa N., Wada I., Hasegawa K., Yorihuzi T., Tremblay L.O., Herscovics A., Nagata K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.* **2(5)**: 415-22.
- Hu W., Howard M., Lukacs G.L. (2001). Multiple endocytic signals in the C-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem J.* **354(Pt 3)**: 561-72.
- Hummler E., Barker P., Gatzky J., Beermann F., Verdumo C., Schmidt A., Boucher R., Rossier B.C. (1996). Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet.* **12(3)**: 325-8

Hwang T.C., Horie M., Gadsby D.C. (1993). Functionally distinct phospho-forms underlie incremental activation of protein kinase-regulated Cl⁻ conductance in mammalian heart. *J. Gen. Physiol.* **101(5)**: 629-50.

Hwang T.C., Nagel G., Nairn A.C., Gadsby D.C. (1994). Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **91(11)**: 4698-702.

I

Imundo L., Barasch J., Prince A., Al-Awqati Q. (1995). Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 3019-23.

Inagaki N., Gonoi T., Clement J.P. 4th, Namba N., Inazawa J., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Seino S., Bryan J. (1995). Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science.* **270(5239)**: 1166-70.

Inoue Y., Fishman P.H., Rebois R.V. (1990). Differential activation of the stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins by fluoroaluminate in cells and in membranes. *J. Biol. Chem.* **265(18)**: 10645-51.

Ismailov I.I., Jovov B., Fuller C.M., Berdiev B.K., Keeton D.A., Benos D.J. (1996). G-protein regulation of outwardly rectified epithelial chloride channels incorporated into planar bilayer membranes. *J Biol Chem.* **271(9)**: 4776-80.

J

Jager S., Groll M., Huber R., Wolf D.H., Heinemeyer W. (1999). Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol.* **291(4)**: 997-1013.

Jakob C.A., Bodmer D., Spirig U., Battig P., Marcil A., Dignard D., Bergeron J.J., Thomas D.Y., Aebi M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep.* **2(5)**: 423-30.

Jensen T.J., Loo M.A., Pind S., Williams D.B., Goldberg A.L., Riordan J.R. (1995). Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell.* **83(1)**: 129-35.

Johnston J.A., Ward C.L., Kopito R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell. Biol.* **143(7)**: 1883-1898.

Jovov B., Ismailov I.I., Berdiev B.K., Fuller C.M., Sorscher E.J., Dedman J.R., Kaetzel M.A., Benos D.J. (1995a). Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J Biol Chem.* **270(49)**: 29194-200.

Julien M., Verrier B., Cerutti M., Chappe V., Gola M., Devauchelle G., Becq F. (1999) ; Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) confers glibenclamide sensitivity to outwardly rectifying chloride channel (ORCC) in Hi-5 insect cells. *J. Membr. Biol.* **168(3)**: 229-39.

K

Kahn R.A. (1991) Fluoride is not an activator of the smaller (20-25 kDa) GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **266(24)**: 15595-7.

- Kalies K.U., Allan S., Sergeyenko T., Kroger H., Romisch K. (2005). The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* **24(13)**: 2284-93.
- Kälin N., Claaß A., Sommer M., Puchelle E., Tümmler B. (1999). Δ F508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **103**: 1379-1389.
- Kamhi-Nesher S., Shenkman M., Tolchinsky S., Vigodman F., Ehrlich R., Lederkremer G.Z. (2001). A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1711-1723.
- Kaminski W.E., Piehler A., Wenzel J.J. (2006). ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta.* **1762**: 510-524.
- Kanalo Y., Moss J., Vaughan M; (1985). Mechanism of inhibition of transducin GTPase activity by fluoride and aluminium. *J; Biol. Chem.* **260**: 11493-11497.
- Kartner N., Augustinas O., Jensen T.J., Naismith A.L., Riordan J.R. (1992). Mislocalization of delta F508 CFTR in cystic fibrosis sweat gland. *Nat Genet.* **1(5)**: 321-7.
- Kelley T.J., al-Nakkash L., Drumm M.L. (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.
- Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**: 073-1080.
- Kidd J.F., Ramjeesingh M., Stratford F., Huan L.J., Bear C.E. (2004). A heteromeric complex of the two nucleotide binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mediates ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **279(40)**: 41664-9.
- Kim K.B., Myung J., Sin N., Crews C.M. (1999). Proteasome inhibition by the natural products epoxomicin and dihydroeponemycin: insights into specificity and potency. *Bioorg Med Chem Lett.* **9(23)**: 3335-40.
- Klein I., Sarkadi B., Varadi A. (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1461**: 237-262.
- Knowles M., Gatzky J., Boucher R. (1981a). Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **305(25)**: 1489-95.
- Knowles M.R., Carson J.L., Collier A.M., Gatzky J.T., Boucher R.C. (1981b). Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo. *Am. Rev. Respir. Dis.* **124(4)**: 484-90.
- Knowlton R.G., Cohen-Haguenaer O., Van Cong N., Frezal J., Brown V.A., Barker D., Braman J.C., Schumm J.W., Tsui L.C., Buchwald M., *et al.* (1985). A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature.* **318(6044)**: 380-382.
- Kopito R.R. (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol. Rev.* **79**: S167-S173.
- Kopito R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10(12)**: 524-30.
- Kowarik M., Kung S., Martoglio B., Helenius A. (2002). Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell.* **10(4)**: 769-78.

Kreda S.M., Mall M., Mengos A., Rochelle L., Yankaskas J., Riordan J.R, Boucher R.C. (2005). Characterization of wild-type and $\Delta F508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human respiratory epithelia. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2154-2167.

Kuehn M.J., Schekman R. (1997). COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr Opin Cell Biol.* **9(4)**: 477-83.

Kunzelmann K., Kiser G.L., Schreiber R., Riordan J.R. (1997). Inhibition of epithelial Na^+ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett.* **400(3)**: 341-4.

Kurose H. (2003). $\text{G}\alpha_{12}$ and $\text{G}\alpha_{13}$ as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sciences* **74**: 155-161.

L

Lee D.H., Goldberg A.L. (1998). Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **18(1)**: 30-8.

Lee M.G., Wigley W.C., Zeng W., Noel L.E., Marino C.R., Thomas P.J., Muallem S. (1999a). Regulation of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. *J Biol Chem.* **274(6)**: 3414-21.

Lee M.G., Choi J.Y., Luo X., Strickland E., Thomas P.J., Muallem S. (1999b). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J Biol Chem.* **274(21)**: 14670-7.

Lenk U., Yu H., Walter J., Gelman M.S., Hartmann E., Kopito R.R., Sommer T. (2002). A role for mammalian Ubc6 homologues in ER-associated protein degradation. *J Cell Sci.* **115(Pt 14)**: 3007-14.

Lewis H.A. *et al.* (2004). Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The EMBO J.* **23**: 282-293.

Lewis H.A., Zhao X., Wang C., Sauder J.M., Rooney I. *et al.* (2005). Impact of the $\Delta F508$ mutation in first nucleotide binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J. Biol. Chem.* **280(2)**: 1346-1353.

Li C., Ramjeesingh M., Bear C.E. (1999b). Purified cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) does not function as an ATP channel. *J Biol Chem.* **271(20)**: 11623-6.

Li C., Naren A.P. (2005). Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacology & Therapeutics.* **108**: 208-223.

Li X., Lonard D.M., Jung S.Y., Malovannaya A., Feng Q., Qin J., Tsai S.Y., Tsai M.J., and O'Malley B.W. (2006) The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REGgamma proteasome. *Cell.* **124(2)**: 381-92.

Liang L. (2003). The biochemistry and physiology of metallic fluoride: action, mechanism, and implications. *Crit Rev Oral Biol Med* **14(2)**: 100-114.

Liberek K., Skowrya D., Zylicz M., Johnson C., Georgopoulos C. (1991). The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J Biol Chem.* 1991 **266(22)**: 14491-6.

- Lilley B.N., Ploegh H.L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*. **429(6994)**: 834-40.
- Linsdell P., Evagelidis A., Hanrahan J.W. (1997a). Molecular determinants of anion selectivity in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *Biophys J*. **78(6)**: 2973-82.
- Linsdell P. (2005). Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp Physiol*. **91**: 123-129.
- Liu Y., Choudhury P., Cabral C.M., and Sifers R.N. (1999). Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem*. **274(9)**: 5861-7.
- Liu C.Y., Xu Z., Kaufman R.J. (2003). Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1 α . *J Biol Chem*. **278(20)**: 17680-7.
- Loo M.A., Jensen T.J., Cui L., Hou Y.X., Chang X.B., Riordan R.R. (1998). Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *The EMBO J*. **17(23)**: 6879-6887.
- Loo T.W., Clarke D.M. (1998). Quality control by proteases in the endoplasmic reticulum. Removal of a protease-sensitive site enhances expression of human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem*. **273(49)**: 32373-6.
- Loo T.W., Bartlett M.C., Clarke D.M. (2005, b). Rescue of folding defects in ABC transporters using pharmacological chaperones. *J. Bioenerg. Biomembr*. **37(6)**: 501-507.
- Loo T.W., Bartlett M.C., Clarke D.M. (2006). Insertion of an arginine residue into the transmembrane segments corrects protein misfolding. *J. Biol. Chem*. **281(40)**: 29436-40.
- Loussouarn G., Demolombe S., Mohammad-Panah R., Escande D., Baro I.(1996). Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am. J. Physiol*. **271**: C1565-73.
- Löwe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W., Huber R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**: 533-539.
- Lu M., Leng Q., Egan M.E., Caplan M.J., Boulpaep E.L., Giebisch G.H., Hebert S0C. (2006). CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J Clin Invest*. **116(3)**: 797-807.
- Lu C., Jiang C., Pribanic S., Rotin D. (2007). CFTR stabilizes ENaC at the plasma membrane. *J. Cys. Fibrosis*. **Doi:10.1016/J.JCF.2007.03.001**.
- Lukacs G.L., Chang X.B., Bear C., Kartner N., Mohamed A., Riordan J.R., Grinstein S. (1993). The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J Biol Chem*. **268(29)**: 21592-8.
- Lukacs G.L., Mohamed A., Kartner N., Chang X.B., Riordan J.R., Grinstein S. (1994). Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (Δ F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *The EMBO J*. **13**: 6076-6086.

Lukacs G.L., 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.

Luo J., Pato M.D., Riordan J.R., Hanrahan J.W. (1998). Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am. J. Physiol.* **274(5 Pt 1)**: C1397-410.

M

Mall M., Hipper A., Greger R., Kunzelmann K. (1996). Wild type but not deltaF508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Letters.* **381(1-2)**: 47-52.

Mall M., Bleich M., Greger R., Schreiber R., Kunzelmann K. (1998). The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J. Clin. Invest.* **102**: 15-21.

Mall M., Bleich M., Kuchr J., Brandis M., Greger R., Kunzelmann K. (1999). CFTR mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol.* **277**: G709-16.

Mancini R., Aebi M., and Helenius A. (2003). Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **278(47)**: 46895-905.

Marcet B., Chappe V., Delmas P., Gola M., Verrier B. (2003). Negative regulation of CFTR activity by extracellular ATP involves P2Y2 receptors in CFTR-expressing CHO cells. *J Membr Biol.* **194(1)**: 21-32.

McCracken A.A., Brodsky J.L. (2003). Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *Bioessays.* **25(9)**: 868-77.

McNicholas C.M., Yang Y., Giebisch G., Hebert S.C. (1996). Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K⁺ channel (ROMK2). *Am J Physiol.* **271(2 Pt 2)**: F275-85.

Meacham G.C., Lu Z., King S., Sorscher E., Tousson A., Cyr D.M. (1999). The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J.* **18(6)**: 1492-505.

Meacham G.C., Patterson C., Zhang W., Younger J.M., Cyr D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* **3**: 100-105.

Millman J.S., Andrews D.W. (1997). Switching the model: a concerted mechanism for GTPases in protein targeting. *Cell.* **89**: 673-676.

Mickle J.E., Macek M. Jr, Fulmer-Smentek S.B., Egan M.M., Schwiebert E., Guggino W., Moss R., Cutting G.R. (1998). A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene associated with elevated sweat chloride concentrations in the absence of cystic fibrosis. *Hum Mol Genet.* **7(4)**: 729-35.

Mittal R., Ahmadian M.R., Goody R.S., Wittinghofer (1996). Formation of a transition-state analog of the Ras GTPase reaction by Pas.GDP, tetrafluoroaluminate, and GTPase-Activating proteins. *Science* **273**: 115-117.

Molinari M., Calanca V., Galli C., Lucca P., Paganetti P. (2003). Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* **299**: 1397-1400.

Morales M.M., Carroll T.P., Morita T., Schwiebert E.M., Devuyst O., Wilson P.D., Lopes A.G., Stanton B.A., Dietz H.C., Cutting G.R., Guggino W.B. (1996). Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am. J. Physiol.* **270**: F1038-48.

Mori K., Sant A., Kohno K., Normington K., Gething M.J., Sambrook J.F. (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J.* **11(7)**: 2583-93.

Morris A.P., Frizzell R.A. (1994). Vesicle targeting and ion secretion in epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *Annu Rev Physiol.* **56**: 371-97.

Moyer B.D., Duhaime M., Shaw C., Denton J., Reynolds D., Karlson K.H., Pfeiffer J., Wang S., Mickle J.E., Milewski M., Cutting G.R., Guggino W.B., Li M., Stanton B.A. (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 B.D., Denton J., Karlson K.H., Reynolds D., Wang S., Mickle J.E., Milewski M., Cutting G.R., Guggino W.B., Li M., Stanton B.A. (1999). A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest.* **104(10)**: 1353-61.

Mukherjee S., Ghosh R.N., Maxfield F.R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev.* **77(3)**: 759-803.

N

Nanua S., Sajjan U., Keshavjee S., Hershenson M.B. (2006). Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **343(1)**: 135-43.

Naren A.P., Nelson D.J., Xie W., Jovov B., Pevsner J., Bennett M.K., Benos D.J., Quick M.W., Kirk K.L. (1997). Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. *Nature.* **390(6657)**: 302-5.

Naren A.P., Cormet-Boyaka E., Fu J., Villain M., Blalock J.E., Quick M.W., Kirk K.L. (1999). CFTR chloride channel regulation by an interdomain interaction. *Science.* **286**: 544-548.

Neuber O., Jarosch E., Volkwein C., Walter J., Sommer T. (2005). Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol.* **7(10)**: 993-8.

Ng D.T., Spear E.D., Walter P. (2000). The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J. Cell Biol.* **150(1)**: 77-88.

Nikolay R., Wiederkehr T., Rist W., Kramer G., Mayer M.P., Bukau B. (2004). Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J Biol Chem.* **279(4)**: 2673-8.

Nilius B., Droogmans G. (2003) Amazing chloride channels : an overview. *Acta Physiol. Scand.* **177**: 119-147.

Norez C., Noel S., Wilke M., Bijvelds M., Jorna H., Melin P., DeJonge H., Becq F. (2006). Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett.* **580(8)**: 2081-6.

O

Oberdorf J., Carlson E.J., Skach W.R. (2001). Redundancy of mammalian proteasome beta subunit function during endoplasmic reticulum associated degradation. *Biochemistry*. **40(44)**: 13397-405.

Oberdorf J., Pitonzo D., Skach W.R. (2005). An energy-dependent maturation step is required for release of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from early endoplasmic reticulum biosynthetic machinery. *J Biol Chem*. **280(46)**: 38193-202.

Oberdorf J., Carlson E.J., Skach W.R. (2006). Uncoupling proteasome peptidase and ATPase activities results in cytosolic release of an ER polytopic protein. *J. Cell. Science*. **119**: 303-313.

Okamura K., Kimata Y., Higashio H., Tsuru A., Kohno K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*. **279(2)**: 445-50.

Okiyoneda T., Harada K., Takeya M., Yamahira K., Wada I., Shuto T., Suico M.A., Hashimoto Y., Kai H. (2004). Δ F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol. Biol. Cell*. **15**: 563-574.

Okiyoneda T., Harada K., Yamahira K., Wada I., Hashimoto Y., Ueno K., Suico M.A., Shuto T., Kai H. (2004). Characterization of the trafficking pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in baby hamster kidney cells. *J. Pharmacol. Sci*. **95**: 471-475.

Oliver J.D., van der Wal F.J., Bulleid N.J., High S. (1997). Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science*. **275(5296)**: 86-8.

Orino E., Tanaka K., Tamura T., Sone S., Ogura T., Ichihara A. (1991). ATP-dependent reversible association of proteasomes with multiple protein components to form 26S complexes that degrade ubiquitinated proteins in human HL60 cells. *FEBS* **284(2)**: 206-210.

Orlowski M., Cardozo C., Michaud C. (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* **32**: 1563-72.

Ostedgaard L.S., Randak C., Rokhlina T., Karp P., Vermeer D., Ashbourne Excoffon K.J., Welsh M.J. (2003). Effects of C-terminal deletions on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in cystic fibrosis airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100(4)**: 1937-42.

Ostrowska H., Wojcik C., Omura S., Worowski K. (1997). Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. **234(3)**: 729-32.

P

Pall M.L. (1985). GTP: a central regulator of cellular anabolism. *Curr Top Cell Regul*. **25**: 1-20.

Papa F.R., Hochstrasser M. (1993). The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* **366**: 313-9.

Papini E., de Bernard M., Bugnoli M., Milia E., Rappuoli R., Montecucco C. (1993). Cell vacuolization induced by *Helicobacter pylori*: inhibition by bafilomycins A1, B1, C1 and D. *FEMS Microbiol Lett*. **113(2)**: 155-9.

- Parodi A.J. (2000). Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J.* **348(1)**: 1-13.
- Pasyk E.A., Morin X.K., Zeman P., Garami E., Galley K., Huan L.J., Wang Y., Bear C.E. (1998). A conserved region of the R domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is important in processing and function. *J Biol Chem.* **273(48)**: 31759-64.
- Pedersen P.L. (2005). Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview. *J. Bioenerg Biomembr.* **37(6)**: 349-357.
- Pelham H.R.B. (1997). Green light for Golgi traffic. *Nature.* **389**: 17-20.
- Peters J.M. (1994). Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 377-82.
- Petersen O.H. et Philpott H.G. (1980). Mouse pancreatic acinar cells: the anion selectivity of the acetylcholine-opened chloride pathway. *J. Physiol.* **306**: 481-92.
- Picciano J.A., Ameen N., Grant B.D., Bradbury N.A. (2003). Rme-1 regulates the recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Cell Physiol.* **285(5)**: C1009-18.
- Pier G.B., Grout M., Zaidi T.S., Goldberg J.B.. (1996). Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science.* **271**: 64-67.
- Pilewski J.M. and Frizzell R.A. (1999). Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev.* **79**: S215-55.
- Pind S., Riordan J.R., Williams D.B. (1994). Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **269(17)**: 12784-8.
- Plempner R.K., Bohmler S., Bordallo J., Sommer T., Wolf D.H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature.* **388(6645)**: 891-5.
- Poole B., Ohkuma S., Warburton M.J. (1977). The accumulation of weakly basic substances in lysosomes and the inhibition of intracellular protein degradation. *Acta Biol Med Ger.* **36(11-12)**: 1777-88.
- Poschet J.F., Boucher J.C., Tattersson L., Skidmore J., Van Dyke R.W., Deretic V. (2001). Molecular basis for defective glycosylation and Pseudomonas pathogenesis in cystic fibrosis lung. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 13972-77.
- Presley J.F., Cole N.B., Schroer T.A., Hirschberg K., Zaal K.J., Lippincott-Schwartz J (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389(6646)**: 81-5.
- Prince L.S., Workman R.B. Jr, Marchase R.B. (1994). Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91(11)**: 5192-6.
- Prince L.S., Peter K., Hatton S.R., Zaliauskiene L., Cotlin L.F., Clancy J.P., Marchase R.B., Collawn J.F. (1999). Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal. *J Biol Chem.* **274(6)**: 3602-9.
- Puhler G., Weinkauff S., Bachmann L., Muller S., Engel A., Hegerl R., Baumeister W. (1992). Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *EMBO J.* **11**: 1607-16.

Q

Qu B.H., Strickland E.H., Thomas P.J. (1997). Localization and suppression of a kinetic defect in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding. *J. Biol. Chem.* **272(25)**: 15739-44.

Qui W., Kohen-Avramoglu R., Rashid-Kolvear F., Au C.S., Chong T.M., Lewis G.F., Trinh D., Austin R.C., Urade R., Adeli K. (2004). Overexpression of the endoplasmic reticulum 60 protein ER-60 downregulates ApoB100 secretion by inducing its intracellular degradation via a nonproteasomal pathway; evidence for an ER-60-mediated and pCMB-sensitive intracellular degradative pathway. *Biochemistry* **43**: 4819-4831.

Quinton P.M. (1983a). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*. **301(5899)**: 421-2.

Quinton P.M. (1983b). Sweating and its disorders. *Annu Rev Med.* **34**: 429-52.

R

Raghuram V., Hormuth H., Foskett J.K. (2003). A kinase-regulated mechanism controls CFTR channel gating by disrupting bivalent PDZ domain interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100(16)**: 9620-9625.

Randak C., Neth P., Auerswald E.A., Assfalg-Machleidt I., Roscher A.A., Hadorn H.B., Machleidt W. (1996). A recombinant polypeptide model of the second predicted nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a GTP-binding protein. *FEBS Lett.* **398(1)**: 97-100.

Ratjen F., Döring G. (2003). Cystic Fibrosis. *The Lancet* **361**: 681-689.

Reddy M.M., Quinton P.M., Haws C., Wine J.J., Grygorczyk R., Tabcharani J.A., Hanrahan J.W., Gunderson K.L., Kopito R.R. (1996). Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science*. **271(5257)**: 1876-9.

Reddy M.M., Sun D., Quinton P.M. (2001). Apical heterotrimeric G-proteins activate CFTR in the native sweat duct. *J. Membr. Biol.* **179**: 51-61.

Reddy M.M., Quinton P.M. (2003). Functional interaction of CFTR and ENaC in sweat glands. *Pflugers Arch.* **445(4)**: 499-503.

Reddy M.M., Quinton P.M. (2006). ENaC activity requires CFTR channel function independently of phosphorylation in sweat duct. *J. Membr. Biol.* **207**: 23-33.

Reed J.L., Dimayuga F.O., Davies L.M., Keller J.N., and Bruce-Keller A.J. (2004). Estrogen increases proteasome activity in murine microglial cells. *Neurosci. Lett.* **367(1)**: 60-5.

Reigada D., Mitchell C.H. (2005). Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport. *Am J Physiol Cell Physiol.* **288(1)**: C132-40.

Reisin I.L., Prat A.G., Abraham E.H., Amara J.F., Gregory R.J., Ausiello D.A., Cantiello H.F. (1994). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem.* **269(32)**: 20584-91.

Riordan J.R. (2005). Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* **67**: 701-718.

Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alom N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J.L., Drumm M.L., Iannuzzi M.C., Collins F.S., Tsui L.P. (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* **245**: 1066-1072.

Ritter C. and Helenius A. (2000). Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Nat Struct Biol.* **7(4)**: 278-80.

Roa M., Cornet V., Yang C-Z., Goud B. (1993). The small GTP-binding protein rab6p is redistributed in the cytosol by brefeldin A. *J. Cell Science* **106**: 789-802.

Rodgers K.J., Dean R.T. (2003). Assessment of proteasome activity in cell lysates and tissue homogenates using peptide substrates. *Int J Biochem Cell Biol.* **35(5)**: 716-27.

Römisch K. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 435-56.

Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kenndy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L.P., Collins F.S. (1989). Identification of the Cystic Fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059-1065.

Rosenberg M.F., Kamis A.B., Aleksandrov L.A., Ford R.C., Riordan J.R. (2004). Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J. Biol. Chem.* **279(37)**: 39051-39057.

Rüdel R. et Lehmann-Horn F. (1985). Membrane changes in cells from myotonia patients. *Physiol. Rev.* **65(2)**: 310-56.

Ruknudin A., Schulze D.H., Sullivan S.K., Lederer W.J., Welling P.A. (1998). Novel subunit composition of a renal epithelial KATP channel. *J Biol Chem.* **273(23)**: 14165-71.

S

Sadlish H., Skach W.R. (2004). Biogenesis of CFTR and other polytopic membrane proteins: new roles for the ribosome-translocon complex. *J. Membrane Biol.* **202**: 115-126.

Sato S., Ward C.L., Krouse M.E., Wine J.J., Kopito R.R. (1996). Glycerol reverse the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.* **271(2)**: 635-638.

Sato S., Ward C.L., Kopito R.R. (1998). Cotranslational ubiquitination of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **272(13)**: 7189-7192.

Sato K. (2004). COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum. *J Biochem (Tokyo)*. **136(6)**: 755-60.

Saxena S.K., Kaur S. (2006). Regulation of epithelial ion channels by Rab GTPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**: 582-587.

Schekman R., Orci L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science.* **271(5255)**: 1526-33.

Schofield P.R., Darlison M.G., Fujita N., Burt D.R., Stephenson F.A., Rodriguez H., Rhee L.M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T.A., et al. (1987). Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature.* **328(6127)**: 221-7.

- Schmitz G. et Langmann T. (2001). Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. *Curr Opin Lipidol.* **12(2)**: 129-40.
- Schmitz A., Schneider A., Kummer M.P., Herzog V. (2004). Endoplasmic reticulum-localized amyloid beta-peptide is degraded in the cytosol by two distinct degradation pathways. *Traffic.* **5(2)**: 89-101.
- Schneider C., Sepp-Lorenzino L., Nimmegern E., Ouerfelli O., Danishefsky S., Rosen N., Hartl F.U. (1996). Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(25)**: 14536-41.
- 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.
- Schrag J.D., Bergeron J.J., Li Y., Borisova S., Hahn M., Thomas D.Y., Cygler M. (2001). The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell.* **8(3)**: 633-44.
- Schreiber R., Hopf A., Mall M., Greger R., Kunzelmann K. (1999). The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96(9)**: 5310-5.
- Schroder M. (2006). The unfolded protein response. *Mol Biotechnol.* **34(2)**: 279-90.
- Schuberth C., Buchberger A. (2005). Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol.* **7(10)**: 999-1006.
- Schultz B.D., Venglarik C.J., Bridges R.J., Frizzell R.A. (1995). Regulation of CFTR Cl⁻ channel gating by ADP and ATP analogues. *J. Gen. Physiol.* **105(3)**: 329-61.
- Schwartz A.L., Ciechanover A; (1999). The ubiquitine-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 57-74.
- Schwiebert E.M., Morales M.M., Devidas S., Egan M.E., Guggino W.B. (1998). Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 2674-2679.
- Schwiebert E.M., Benos D.J., Egan M.E., Stutts M.J., Guggino W.B. (1999). CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**: S145-S166.
- Schweizer A., Ericsson M., Bachi T., Griffiths G., Hauri H.P. (1993). Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implications for the organization of the ER-to-Golgi pathway. *J Cell Sci.* **104 (Pt 3)**: 671-83.
- Seemuller E., Lupas A., Stock D., Lowe J., Huber R., Baumeister W. (1995). Proteasome From *Thermoplasma Acidophilum* - a Threonine Protease. *Science* **268**: 579-582.
- Seibert F.S., Loo T.W., Clarke D.M., Riordan J.R. (1997). Cystic fibrosis: channel, catalytic, and folding properties of the CFTR protein. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29(5)**: 429-438.
- Seidler U., Blumenstein I., Kretz A., Viellard-Baron D., Rossmann H., Colledge W.H., Evans M., Ratcliff R., Gregor M. (1997). A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent HCO₃⁻ secretion. *J Physiol.* **505 (Pt 2)**: 411-23.

Serre J.L., Mornet E., Simon-Bouy B., Boue J., Boue A. (1993). General cystic fibrosis mutations are usually missense mutations affecting two specific protein domains and associated with a specific RFLP marker haplotype. *Eur. J. Hum. Genet.* **1(4)**: 287-95.

Shan S.O., Walter P. (2005). Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *FEBS Lett.* **579(4)**: 921-6.

Sharma M, Benharouga M, Hu W, Lukacs GL (2001). Conformational and Temperature-sensitive Stability Defects of the Δ F508 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Post-endoplasmic Reticulum Compartments. *J. Biol. Chem.* **276**: 8942-50

Sharma M., Pampinella F., Nemes C., Benharouga M., So J., DU K., Bace K.G., Paspin B., Zherangue N., Stenmark H., Lukacs G.L. (2004). Misfolding diverts CFTR from Recycling to degradation: quality control of early endosomes. *J. Cell. Biol.* **164**: 923-33.

Shen J., Chen X., Hendershot L., Prywes R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell.* **3(1)**: 99-111.

Sheppard D.N., Welsh M.J. (1993). Inhibition of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by ATP-sensitive K⁺ channel regulators. *Ann NY Acad Sci.* **707**: 275-284.

Sheppard D.N., Ostedgaard L.S., Winter M.C., Welsh M.J. (1995). Mechanism of dysfunction of two nucleotide binding domain mutations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator that are associated with pancreatic sufficiency. *EMBO J.* **14(5)**: 876-83.

Sheppard D.N., Robinson K.A. (1997). Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a murine cell line. *J. Physiol.* **503 (Pt 2)**: 333-46.

Sheppard D.N., et Welsh M.J. (1999). Structure and Fonction of the CFTR Chloride Channel. *Physiol. Rev.* **79**: S23-S45.

Short D.B., Trotter K.W., Reczek D., Kreda S.M., Bretscher A., Boucher R.C., Stutts M.J., Milgram S.L. (1998). An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem.* **273(31)**: 19797-801.

Skach W.R. (2006). CFTR: new members join the fold. *Cell.* **127(4)**: 673-5.

Smith J.J., Travis S.M., Greenberg E.P., Welsh M.J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell.* **85**: 229-36.

Smith S.S., Liu X., Zhang Z.R., Sun F., Kriewall T.E., McCarty N.A., Dawson D.C. (2001). CFTR: covalent and noncovalent modification suggests a role for fixed charges in anion conduction. *J. Gen. Physiol.* **118(4)**: 407-31.

Sondermann H., Scheufler C., Schneider C., Hohfeld J., Hartl F.U., Moarefi I. (2001). Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science.* **291(5508)**: 1553-7.

Song C., Wang Q., Li C.C. (2003). ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity. *J Biol Chem.* **278(6)**: 3648-55.

- Sood R., Porter A.C., Ma K., Quilliam L.A., Wek R.C. (2000). Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 alpha kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediates translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem. J.* **346**: 281-293.
- Sousa M., Parodi A.J. (1995). The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *EMBO J.* **14(17)**: 4196-203.
- Spiegel S., Phillipper M., Rossmann H., Riederer B., Gregor M., Seidler U. (2003). Independence of apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange and anion conductance in duodenal HCO₃⁻ secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **285(5)**: G887-97.
- Stafford F.J., Bonifacino J.S. (1991). A permeabilized cell system identifies the endoplasmic reticulum as a site of protein degradation. *J Cell Biol.* **115(5)**: 1225-36.
- Steagall W.K., Drumm M.L.(1999). Stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent short-circuit currents across DeltaF508 murine intestines. *Gastroenterology.* **116(6)**: 1379-88.
- Stein R.L., Chen Z.J., Melandri F. (1995). Kinetic Studies Of Isopeptidase T - Modulation Of Peptidase Activity By Ubiquitin. *Biochemistry* **34**: 12616-12623.
- Stratford F.L., Pereira M.M., Becq F., McPherson M.A., Dormer R.L. (2003). Benzo(c)quinolizinium drugs inhibit degradation of Delta F508-CFTR cytoplasmic domain. *Biochem Biophys Res Commun.* **300(2)**: 524-30.
- Strickland E., Qu B.H., Millen L., Thomas P.J. (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**: 15739-15744.
- Stutts M.J., Gabriel S.E., Olsen J.C., Gatz J.T., O'Connell T.L., Price E.M., Boucher R.C. (1993). Functional consequences of heterologous expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in fibroblasts. *J Biol Chem.* **268(27)**: 20653-8.
- Stutts M.J., Canessa C.M., Olsen J.C., Hamrick M., Cohn J.A., Rossier B.C., Boucher R.C. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science.* **269(5225)**: 847-50.
- Sugita M., Yue Y., Foskett J.K. (1998). CFTR Cl⁻ channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates. *EMBO J.* **17(4)**: 898-908.
- Suh K., Gabel C.A., Bergmann J.E. (1992). Identification of a novel mechanism for the removal of glucose residues from high mannose-type oligosaccharides. *J Biol Chem.* **267(30)**: 21671-7.
- Sutton R.B., Fasshauer D., Jahn R., Brunger A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* **395(6700)**: 347-53.
- Swiatecka-Urban A., Duhaime M., Coutermarsh B., Karlson K.H., Collawn J., Milewski M., Cutting G.R., Guggino W.B., Langford G., Stanton B.A. (2002). PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **277(42)**: 40099-105.

T

Tabcharani J.A., Rommens J.M., Hou Y.X., Chang X.B., Tsui L.C., Riordan J.R., Hanrahan J.W. (1993). Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature*. **366(6450)**: 79-82.

Tabcharani J.A., Linsdell P., Hanrahan J.W. (1997). Halide permeation in wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels. *J Gen Physiol*. **110(4)**: 341-54.

Tirasophon W., Welihinda A.A., Kaufman R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Gene Dev*. **12**: 1812-1824.

Thelin W.R., Kesimer M., Tarran R., Kreda S.M., Grubb B.R., Sheehan J.K., Stutts M.J., Milgram S.L. (2005). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is regulated by a direct interaction with the protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*. **280(50)**: 41512-20.

Thomas P.J., Shenbagamurthi P., Sondek J., Hulihan J.M., Pedersen P.L. (1992). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Effects of the most common cystic fibrosis-causing mutation on the secondary structure and stability of a synthetic peptide. *J. Biol. Chem*. **267(9)**: 5727-30.

Thomas P.J., Qu B.H., Pedersen P.L. (1995). Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci*. **20**: 456-459.

Tortorella D., Story C.M., Huppa J.B., Wiertz E.J., Jones T.R., Bacik I., Bennink J.R., Yewdell J.W., Ploegh H.L. (1998). Dislocation of type I membrane proteins from the ER to the cytosol is sensitive to changes in redox potential. *J Cell Biol*. **142(2)**: 365-76.

Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., Lockhart D.J., Weissman J.S., Walter P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. **101(3)**: 249-58.

Tsubuki S., Saito Y., Tomioka M., Ito H., Kawashima S. (1996). Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem (Tokyo)*. **119(3)**: 572-6.

Tsui L.C. (1985). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **151(3 Pt 2)**: S47-53.

U

Urade R., Takenaka Y., and Kito M. (1993). Protein degradation by ERp72 from rat and mouse liver endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem*. **268(29)**: 22004-9.

Urano F., Bertolotti A., Ron D. (2000). IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci*. **113 Pt 21**: 3697-702.

V

Vaiskunaite R., Kozasa T., Voino-Yasenetskaya T.A. (2001). Interaction between the G alpha subunit of heterotrimeric G(12) protein and Hsp90 is required for G alpha(12) signaling. *J Biol Chem*. **276(49)**: 46088-93.

VanSlyke J.K., Deschenes S.M., Musil L.S. (2000). Intracellular transport, assembly, and degradation of wild type and disease-linked mutant gap junction proteins. *Mol. Biol. Cell*. **11**: 1933-1946.

Varga K., Jurkuvenaite A., Wakefield J., Hong J.S., Guimbellot J.S., Venglarik C.J., Niraj A., Mazur M., Sorscher E.J., Collawn J.F., Bebök Z. (2004). Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J. Biol. Chem.* **279(21)**: 22578-22584.

Verkman A.S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci.* **118(Pt 15)**: 3225-32.

W

Wada I., Kai M., Imai S., Sakane F., Kanoh H. (1997). Promotion of transferrin folding by cyclic interactions with calnexin and calreticulin. *EMBO J.* **16(17)**: 5420-32.

Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO J.* **1(8)**: 945-51.

Wang F., Zeltwanger S., Hu S., Hwang T.C. (2000). Deletion of phenylalanine 508 causes attenuated phosphorylation-dependent activation of CFTR chloride channels. *J. Physiol.* **524 Pt 3**: 637-48.

Wang X., Matteson J., An Y., Moyer B., Yoo J., Bannykh S., Wilson I.A., Riordan R.R., Balch W.E. (2004). COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J. Cell. Biol.* **167(1)**: 65-74.

Wang X., Venable J., LaPointe P., Hutt D.M., Koulov A.V., Coppinger J., Gurkan C., Kellner W., Matteson J., Plutner H., Riordan J.R., Kelly J.W. Yates J.R. 3rd, Balch W.E. (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell.* **127(4)**: 803-15.

Wang X.Z., Harding H.P., Zhang Y., Jolicoeur E.M., Kuroda M., Ron D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress response. *EMBO J.* **17**: 5708-5717.

Wang Y., Shen J., Arenzana N., Tirasophon W., Kaufman R.J., Prywes R. (2000). Activation of ATF6 and ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* **275**: 27013-27020.

Wang W., He Z., O'Shaughnessy T.J., Rux J., Reenstra W.W. (2002) Domain-domain associations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Cell Physiol.* **282(5)**: C1170-80.

Wang Y., Ho G., Zhang J.J., Nieuwenhuijsen B., Edris W., Chanda P.K., Young K.H. (2002). Regulator of G protein signaling Z1 (RGSZ1) interacts with G_{oi} subunits and regulates G_{oi}-mediated cell signaling. *J. Biol. Chem.* **277(50)**: 48325-48332.

Ward C.L., Kopito R.R. (1994). Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **269(41)**: 25710-25718.

Ward C.L., Omura S., Kopito R.R. (1995). Degradation of CFTR by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cell* **83**: 121-127.

Ware F.E., Vassilakos A., Peterson P.A., Jackson M.R., Lehrman M.A., Williams D.B. (1995). The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem.* **270(9)**: 4697-704.

Watt W.C., Lazarowski E.R., Boucher R.C. (1998). Cystic fibrosis transmembrane regulator-independent release of ATP. Its implications for the regulation of P2Y2 receptors in airway epithelia. *J Biol Chem.* **273(22)**: 14053-8.

Waxman L., Fagan J.M., Goldberg A.L. (1987). Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* **262(6)**: 2451-2457.

Wegele H., Muller L., Buchner J. (2004). Hsp70 and Hsp90, a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **151**: 1-44.

Wei X., Eisman R., Xu J., Harsch A.D., Mulberg A.E., Bevins C.L., Glick M.C., Scanlin T.F. (1996). Turnover of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): slow degradation of wild-type and delta F508 CFTR in surface membrane preparations of immortalized airway epithelial cells. *J Cell Physiol.* **168(2)**: 373-84.

Weixel K.M., Bradbury N.A. (2000). The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J Biol Chem.* **275(5)**: 3655-60.

Wigley W.C., Vijayakumar S., Jones J.D., Slaughter C., Thomas P.J. (1998). Transmembrane domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: design, characterization, and secondary structure of synthetic peptides m1-m6. *Biochemistry.* **37(3)**: 844-53.

Wigley W.C., Fabunmi R.P., Lee M.G., Marino C.R., Muallem S., DeMartino G.N., Thomas P.J. (1999). Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J. Cell. Biol.* **145(3)**: 481-490.

Wittinghofer A. (1997). Signaling mechanistics: Aluminium fluoride for molecule of the year. *Current Biology* **7**: R682-R685

Wittinghofer A., Scheffzek K., Ahmadian M.R. (1997). The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Letters* **410**: 63-67

Wojcik C., DeMartino G.N. (2003). Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol.* **35(5)**: 579-89.

Wolfe M.S., Kopan R. (2004). Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science.* **305**: 1119-1123.

Wolins N., Bosshart H., Kuster H., Bonifacino J.S. (1997). Aggregation as a determinant of protein fate in post-Golgi compartments: role of the luminal domain of furin in lysosomal targeting. *J. Cell. Biol.* **139**: 1735-1745.

x

Xiaotao L., Amazit L., Long W., Lonard D.M., Monaco J.J., O'Malley B.W. (2007). Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGγ-proteasome pathway. *Mol. Cell.* **26**: 831-842.

Xie Y., Schafer J.A. (2004). Inhibition of ENaC by intracellular Cl⁻ in an MDCK clone with high ENaC expression. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287(4)**: F722-31.

Xiong X., Chong E., Skach W.R. (1999). Evidence that endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is linked to retrograde translocation from the ER membrane. *J. Biol. Chem.* **274(5)**: 2616-2624.

γ

Yang Y., Janich S., Cohn J.A., Wilson J.M. (1993). The common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9480-9484.

Ye Y., Meyer H.H., Rapoport T.A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J. Cell Biol.* **162**: 71-84.

Ye Y., Shibata Y., Yun C., Ron D., Rapoport T.A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*. **429(6994)**: 841-7.

Yoo J.S., Moyer B.D., Bannykh S., Yoo H., Riordan R.R., Balch W.E. (2002). Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **277(13)**: 11401-11409.

Yoo D., Flagg T.P., Olsen O., Raghuram V., Foskett J.K. (2004). Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir1.1) Channel complex by PDZ Interactions. *J. Biol. Chem.* **279(8)**: 6863-6873.

Youker R.T., Walsh P., Beilharz T., Lithgow T., Brodsky J.L. (2004). Distinct roles for the Hsp40 and Hsp90 molecular chaperones during cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation in yeast. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 4787-4797.

Younker J.M., Ren H.Y., Chen L., Fan C.Y., Fields A., Patterson C., Douglas M.C. (2004). A foldable CFTR-ΔF508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. *J. Cell. Biol.* **167(6)**: 1075-1085.

Younker J.M., Chen L., Ren H.Y., Fan C.Y., Rosser M.F.N., Turnbull E.L., Fields A., Patterson C., Douglas M.C. (2006). Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell.* **126(3)**: 571-582.

Yu H., Kaung G., Kobayashi S., Kopito R.R. (1997). Cytosolic degradation of T-cell receptor alpha chains by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **272**: 20800-20804.

Yue H., Devidas S., Guggino W.B. (2002). The two halves of CFTR form a dual-pore ion channel. *J. Biol. Chem.* **275(14)**: 10030-4.

Yurko-Mauro K.A., Reenstra W.W. (1998). Prostaglandin F2alpha stimulates CFTR activity by PKA- and PKC-dependent phosphorylation. *Am. J. Physiol.* **275(3 Pt 1)**: C653-60.

Z

Zapun A., Darby N.J., Tessier D.C., Michalak M., Bergeron J.J., Thomas D.Y. (1998). Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem.* **273(11)**: 6009-12.

Zhang F., Kartner N., Lukacs G.L. (1998). Limited proteolysis as a probe for arrested conformational maturation of delta F508 CFTR. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 180-3.

Zhang F., Hamanaka R.B., Bobrovnikova-Marjon E., Gordan J.D., Dai M.S., Lu H., Simon M.C., Diehl J.A. (2006). Ribosomal stress couples the unfolded protein response to p53-dependent cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **281(40)**: 30036-45.

Zhang H., Peters K.W., Sun F., Marino C.R., Lang J., Burgoyne R.D., Frizzell R.A. (2002). Cysteine string protein interacts with and modulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **277(32)**: 28948-58.

Zhang H., Schmidt F.S., Condliffe S.B., Butterworth M.B., Youker R.T., Brodsky J.L., Aridor M., Frizzell R.A. (2006). Cysteine string protein monitors late steps in CFTR biogenesis. *J. Biol. Chem.* **281(16)**: 11312-21.

Zhang X.M., Wang X.T., Yue H., Leung S.W., Thibodeau P.H., Thomas P.J., Guggino S.E. (2003). Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* **278(51)**: 51232-42.

Zhang Y., Nijbroek G., Sullivan M.L., McCracken A.A., Watkins S.C., Michaelis S., Brodsky J.L. (2001). Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Mol. Biol. Cell.* **12**: 1303-1314.

Zhou Y, MacKinnon R. (2003). The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J. Mol. Biol.* **333(5)**: 965-75.

Zielenski J., Tsui L.C. (1995). Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 777-807.

Annexes

Abréviations

CV

Publications

A

AA	Acides Aminés
AAA -ATPase	ATPase Associated with various cellular Activities
ABC	ATP Binding Cassette
Ac	Anticorps
ADN	Acide DeoxyriboNucléique
ADNc	Acide DeoxyriboNucléique complémentaire
AE	Activité Enzymatique
AE2	Anion Exchanger 2
AlCl ₃	Chlorure d'Aluminium
AlF ₄ ⁻	forme majoritaire des complexes fluoroaluminates
AMC	4-MethylCoumarinyl-7-Amide
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK	Adénosine MonoPhosphate Kinase
AP-1 / AP-2	Protéine Adaptatrice
APP :	Activité Protéolytique du Protéasome
ApoB100	Apolipoprotéine B100
AQP	Aquaporine
ARLI	Activité Résiduelle Lactacystine-Indépendante
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
AS	Activité Spécifique
ATF6	Activating Transcription Factor
ATP	Adénosine TriPhosphate

B

Baf	Bafilomycine
BAG	Bcl-2 associated Anti-death Gene
BES	N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
BSA	Sérum Albumine Bovine
BFA	Brefelfine A
BHK	Baby Hamster Kidney
BiP	Binding Ig Protein
Br ⁻	ion Bromure

C

C	C-ter, C-terminal
Ca ²⁺	ion Calcium
CAL	CFTR Associated Ligand
CAP70	CFTR Associated Protein 70KD
CF	Cystic Fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
Ch-L	Chymotrypsin-Like
Chl	Chloroquine
CHIP	C-terminus of Hsc70 Interacting Protein
CHO	Chinese Hamster Ovaries
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CHX:	Cycloheximide
CK	Cycle de Krebs

Cl ⁻	ion Chlorure
cLac	clasto-Lactacystine β-lactone
CLC	Chloride Channel
CNX	Calnexine
COP	Coatamer Protein
Cos	African green monkey kidney
CR	Corps Résiduel
CRT	Calreticuline
Csp	Cystein String Protein
CV	Corps Vésiculaire
D	
Dab2	Disabled 2
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
Der1	Derlin 1
DEPC	DiEthylPyroCarbonate
DHFR	DiHydrosulfate Reductase
Dia	Diamide
DnaJ	protéine à domaine J
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DTT	DiThioThreitol
E	
E1	Ubiquitine Activating Enzyme
E2	Ubiquitine conjugating Enzyme
E3	Ubiquitine ligase
EBP50	Ezrin Binding Protein 50KDa
ECL	Enhanced ChimioLuminescence
EDEM	Endoplasmic Reticulum enhancing α mannosidases-like protein
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid
EGTA	Ethylene Glycol Tetracetic Acid
eIF2α	eukaryotic Initiation Factor 2α
EMR	Endocytose Médiée par les Recepteurs
ENaC	Epithelial Sodium Channel
Endo H	Endoglycosidase H
EpoX	EpoXomycine
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERC	Endosomal Recycling Compartment
ERGIC	ER/Golgi Intermediate Compartment
ERM	Ezrine Radixine Moesine
ERQC	Endoplasmic Reticulum Quality Control
F	
F ⁻	ion Fluorure
FC	Fraction Cytoplasmique
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FM	Fraction Microsmale
FN	Fraction Nucléaire
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRE	Fraction enrichie en RE
G	
G _{αβγ}	Protéine G hétérotrimérique

GABA _A	Gamma Amino Butiric Acid
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanine Exghange Factor
Glc	Glucose
GlcNAc	N-AcétylGlucosamine
GRP	Glucose Regulated protein
GTP	Guanosine TriPhosphate
GTPase	Protéine hydrolysant le GTP
<i>H</i>	
HA	Hémagglutinine A du virus <i>Influenza</i>
HCO ₃ ⁻	ion Bicarbonate
Hdj	Human DnaJ
Hsc	Heat Shock Cognate
Hsp	Heat Shock Protein
HspBP1	Heat Shock Protein Binding Protein 1
<i>I</i>	
I ⁻	ion Iodure
IMPDH	Inosine MonoPhosphate Déshydrogénase
IP	Iodure de Propidium
IRE1p	Inositol requiring Enzyme 1
<i>K</i>	
K ⁺	ion Potassium
Kir	K ⁺ Inward Rectifier channel
<i>L</i>	
Lac	Lactacystine
LDH	Lactate Déshydrogénase
LSB	Laëmmli Sample Buffer
<i>M</i>	
Mg ²⁺	ion Magnésium
Man	Mannose
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MgATP	Magnesium lié à l'Adénosine TriPhosphate
MPA	Acide Mycophénolique
<i>N</i>	
N	N-ter, N-terminal
Na ⁺	ion Sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
Na ₂ CO ₃	Carbonate de Sodium
NaF	Fluorure de Sodium
NBD	Nucleotide Binding Domain
NH ₄ Cl	Chlorure d'Ammonium
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger Regulatory Factor
Noc	Nocodazole
NTP	Nucléotide TriPhosphate
<i>O</i>	
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Channel
OST	OligoSaccharyl Transferase

P

P	sites de Phosphorylation
P2R	Recepteur Purinergique
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PDZ	PSD-95/Dlg/ZO-1
PERK	double strand RNA activated Protein kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PGPH	PeptidylGlutamyl Peptide Hydrolyzing
PKC	Protéine Kinase C
PIP2	PhosphatidylInositol biPhosphate
PMSF	PhénylMéthylSulfonyl Fluorure
PNGase F	Peptide:N-glycosidase F
PP2A	Protéine Phosphatase 2A
PPI	Peptidyl-Prolyl Isomerases

R

R	domaine régulateur de CFTR
RACK1	Récepteur pour l'Activation de la Kinase C-1
RE	Reticulum Endoplasmique
RC	Regulatory Complex
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium channel
RT	Reverse Transcriptase
RTC	Ribosome Translocon Complex

S

SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SNARE	SNAP Receptor
SRP	Signal Recognition Particule
SV40	Simian Vacuolating Agent 40

T

T _{1/2}	Demi-vie
T-L	Trypsin-Like
TA	Température Ambiante
TCA	Acide TriChloroacétique
TCR α	sous-unité α du récepteur T
TGN	Trans Golgi Network
TM	Segment transmembranaire
TMD	TransMembrane Domain
TNR	TMD1-NBD1-R
TPP II	TriPeptidyl Peptidase II
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate

U

Ub	Ubiquitine
Ubc	Enzyme conjuguant l'ubiquitine ou E2
UGGT	UDP-Glucose GlucosylTransférase
UPR	Unfolded protein Response

VAMP2	<i>V</i>
VIMP1	
VSVG-GFP	
VTC	
	Vesicle Associated Membrane Protein
	VCP-Interacting Membrane Protein 1
	Vesicular Stomatitis Virus G-Green Fluorescent Protein
	Vesicular Tubular Cluster

Acides aminés	Nomenclature tri lettrique	Nomenclature mono lettrique
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Tableau: Nomenclature des acides aminés

De Keukeleire B, Donadio S, Micoud J, Lechardeur D, Benharouga M (2007) Human cellular prion protein hPrPC is sorted to the apical membrane of epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 354(4):949-54.

Oral Communications:

De Keukeleire B, Micoud J, Piccarreta F and Benharouga M. Degradation of $\Delta F508$ -CFTR in the endoplasmic reticulum: ATPase or GTPase pathways. *Colloque des jeunes chercheurs sur la mucoviscidose, 2005, Paris (France).*

Posters:

De Keukeleire B, Micoud J, Donadio S, Piccarreta F and Benharouga M. Uncorrelated proteasome peptidase and ATPase activities for endoplasmic reticulum (ER) degradation of $\Delta F508$ CFTR. *Colloque des jeunes chercheurs sur la mucoviscidose, 2007, Paris (France).*

De Keukeleire B, Micoud J, Piccarreta F and Benharouga M. Degradation of $\Delta F508$ -CFTR protein in the endoplasmic requires a GTP-dependent protease(s). *The Nineteenth Annual North American Cystic Fibrosis Conference, 2005, Baltimore (USA).*

De Keukeleire B, Swiercz AL and Benharouga M. Study of the molecular mechanism of CFTR and CFTR- $\Delta F508$ degradation in the endoplasmic reticulum : ATPase or GTPase pathways. *Colloque des jeunes chercheurs sur la mucoviscidose, 2004, Paris (France).*

COMPETENCES

Laboratory techniques:

Cellular Biology:

Cell culture, cell transfection, immunocytochemistry, fluorescence microscopy

Biochemistry:

Western blotting, immunoprecipitation, ELISA immunoassays, subcellular fractionation (differential ultracentrifugation, sucrose gradient), protein purification (Sephacrose-Nickel, Agarose-ATP, Agarose-GTP), pulse-chase

Proteomics:

2D-electrophoresis, mass spectrometry

Molecular Biology:

Molecular cloning, RNA extraction, reverse transcription, fluorescence *in situ* hybridisation (FISH)

Languages:

French:

Mother tongue

English:

Good working knowledge, both written and oral

Computer skills:

Operating systems:

Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint, Access)

Picture processing:

Photoshop, Illustrator, AxioVision, Scion Image

EXTRAPROFESSIONAL ACTIVITIES

Associative activities:

2006-2007: Vice president of ³⁸Globule (PhD student association of Doctoral School in Chemistry and Life Sciences). Organisation of BIOTechno Forum Rhône-Alpes 2007

2005-2006: President of ³⁸Globule. Organisation of BIOTechno Forum Rhône-Alpes 2006

2005-2006: In charge of communication of AITAP (PhD student association of CEA-Grenoble)

Résumé :

70% des mutations identifiées sur le gène responsable de la mucoviscidose correspondent à la délétion de la phénylalanine en position 508 du domaine NBD1 de la protéine CFTR. Cette mutation est responsable, à 37°C, d'un mauvais repliement, du blocage et de la dégradation rapide de CFTR au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Plusieurs études ont montré que CFTR-F508del est dégradée au niveau du cytoplasme par le protéasome après translocation à travers le canal Sec61. Cependant cette dégradation n'est pas affectée par l'ATP et n'est inhibée que partiellement par les inhibiteurs les plus spécifiques du protéasome. Par ailleurs, une série d'observations a suggéré que la dégradation de CFTR-F508del est un processus impliquant d'autres voies protéolytiques dont la nature reste encore inconnue.

Au cours de mon doctorat, j'ai essayé de caractériser ces voies de dégradation en approfondissant le rôle de l'ATP et du protéasome et surtout en mettant en évidence l'implication de voies dépendantes du GTP. Mon travail a été réalisé en deux étapes. La première a porté sur l'étude de la dégradation de CFTR mutée au niveau microsomale, et la deuxième sur la caractérisation de cette voie au niveau cellulaire. L'ensemble des résultats montre, pour la première fois, qu'il n'y a pas de corrélation entre l'activité protéasomale et la dégradation de CFTR-F508del au niveau du RE. Cette dernière est dégradée par une voie GTP-dépendante impliquant les protéines G hétérotrimériques et localisée au niveau du RE.

Mots clés : protéines transmembranaires, mucoviscidose, CFTR-F508del, dégradation, protéasome, ATP, GTP, réticulum endoplasmique, ERAD.

Summary :

F508del -CFTR, the most frequent mutation found in patients with cystic fibrosis (CF), was among the first misfolded membrane proteins for which a role of ubiquitin and proteasome in ERAD was described. However, proteasome-mediated ERAD of membrane proteins is a challenging process because substrate and degradation machinery are located in different cellular compartments. Luminal domains and transmembrane segments of membrane proteins not only need to be unfolded, but should also undergo retrograde translocation and/or extraction from lipid bilayer in order to reach proteolytic sites within the 20S particle. However in the absence of ATP and in the presence of proteasome inhibitors, the degradation of F508del -CFTR is only modestly inhibited, suggesting that other proteolytic system may contribute to the degradation of the mutant CFTR. To date, no other proteases or proteolytic systems have been demonstrated to contribute to the F508del -CFTR elimination. Our present study represents the initial attempt to characterize the proteasome-independent proteolytic pathway of F508del -CFTR.

For the first time, we point out the role of GTP and heterotrimeric G proteins in the disposal of the mutant CFTR. Through our results, we demonstrate that this proteolytic pathway is restricted to RE. In parallel, we also investigated the role of proteasome and ATP in the degradation of F508del -CFTR and showed the absence of correlation between proteasomal activity and the elimination of the mutant CFTR. All together our results suggest that the ER-GTP dependent degradation pathway may be a complementary system that contributes to the disposal of ER-misfolded membrane proteins.

Key words: transmembrane proteins, cystic fibrosis, F508del -CFTR, degradation, proteasome, ATP, GTP, endoplasmic reticulum, ERAD.