



HAL
open science

**Les protéines $G\alpha12$ et $G\alpha13$ dans la mucoviscidose :
Rôle dans la dégradation de la protéine CFTR mutée
F508del et dans le contrôle des jonctions intercellulaires.**

Sylvain Chauvet

► **To cite this version:**

Sylvain Chauvet. Les protéines $G\alpha12$ et $G\alpha13$ dans la mucoviscidose : Rôle dans la dégradation de la protéine CFTR mutée F508del et dans le contrôle des jonctions intercellulaires.. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV082 . tel-00684255

HAL Id: tel-00684255

<https://theses.hal.science/tel-00684255>

Submitted on 31 Mar 2012

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Sylvain CHAUVET

Thèse dirigée par Dr. **Mohamed BENHAROUGA**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la mucoviscidose : Rôle dans la dégradation de la protéine CFTR mutée F508del et dans le contrôle des jonctions intercellulaires.

Thèse soutenue publiquement le **15 Décembre 2011**,
devant le jury composé de :

Monsieur Stefan NONCHEV

Professeur à l'Université de Grenoble, Président

Monsieur Frédéric BECQ

Professeur à l'Université de Poitiers, Rapporteur

Monsieur Marc CHANSON

Docteur à l'Université de Genève, Rapporteur

Madame Muriel JACQUIER-SARLIN

Docteur à l'Université de Grenoble, Membre

Monsieur Mohamed BENHAROUGA

Docteur à l'Université de Grenoble, Directeur de thèse



« C'est par le travail que l'homme se transforme »

Louis Aragon

*« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez
pas à travailler un seul jour de votre vie. »*

Confucius

« On se lasse de tout, excepté d'apprendre »

Virgile

A Alicia,

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Mr le Professeur Frédéric Becq et Mr le Docteur Marc Phanson de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de mon manuscrit de doctorat. Je remercie également Mme le Docteur Muriel Jacquier-Garlin et Mr le Professeur Stephan Nonchev qui ont accepté de faire partie de mon jury.

J'exprime aussi ma gratitude au Professeur Marc Fontecave et au Docteur Stéphane Ménage pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux où a été réalisée cette thèse.

Merci au Docteur Mohamed Benharouga pour son encadrement durant ces 3 années, pour son aide et la confiance qu'il m'a témoigné.

Ce travail ayant pu être réalisé grâce au financement de l'association Vaincre La Mucoviscidose, je remercie également tous ces membres.

Merci au Professeur Pison du service « Hospitalisation Sommeil et Respiration - Insuffisance Respiratoire Chronique - Transplantation pulmonaire » et au Professeur Lantuejoul du service d'« Anatomie Pathologique » pour avoir permis l'accès aux échantillons de tissus humains et facilité l'analyse des résultats obtenus sur ces échantillons.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des membres du laboratoire, et plus particulièrement l'équipe TRIM, puis BioMet.

Un grand merci à tout ceux qui ont fait vivre le bureau 215A : Sylvia et Christelle pour leur soutien lors des débuts difficiles, Nono, Greg et Alexis pour leurs conseils, soutien et bonne humeur, les deux Sophie, Sandra et Caroline pour leur présence et leur écoute. Des remerciements tout particuliers pour « mes » stagiaires : Emma, Maryline et Flora, pour votre constante bonne humeur, votre aide, et pour m'avoir fait aimer l'encadrement scientifique. Merci également à Carole et Florence pour leur enthousiasme.

Je remercie Peggy, pour toute l'aide et le soutien, autant technique que morale, en particulier aux débuts. Séverine, pour son amitié, sa joie et sa compagnie. Julien (alias Daddy492, Bob le bricoleur, Jujju, Minou...) également pour son amitié et sa bonne humeur.

Merci à Nadia et Sophie pour leur aide.

Un grand merci à toute ma famille, et particulièrement à mes parents pour m'avoir toujours poussé et soutenu dans mes choix. Ce que je suis devenu, je vous le dois.

Enfin, merci à Ingrid et Alicia, ma femme et ma fille, qui me donnent chaque jour la force d'aller plus loin.

Sommaire

<i>Abréviations</i>	15
<i>Introduction</i>	21
I) La mucoviscidose	23
A) Historique	23
Figure I1 : Distribution géographique de la mucoviscidose.	23
B) Données cliniques	24
Figure I2 : La mucoviscidose, une maladie polyviscérale.	24
1) Atteintes pulmonaires	24
2) Atteintes digestives	25
3) Atteintes génitales	25
4) Atteintes endocrines	26
5) Atteintes musculo-squelettiques	26
C) Le gène CF	27
Figure I3 : Les différentes classes de mutations au niveau du gène CF.	27
1) Classe I	28
2) Classe II	28
3) Classe III	28
4) Classe IV	28
5) Classe V	28
6) Classe VI	29
D) La protéine CFTR	29
1) Biosynthèse et maturation	29
a) <u>Biosynthèse</u>	<u>29</u>
b) <u>maturation</u>	<u>30</u>
Figure I4 : Processus de biosynthèse et de maturation de la protéine CFTR.	31
2) Structure prédite	32
Figure I5 : Schéma représentatif de la structure prédite de la protéine CFTR.	33
3) Transport intracellulaire	34
a) <u>RE - appareil de Golgi</u>	<u>34</u>
b) <u>Appareil de Golgi – membrane plasmique</u>	<u>35</u>
4) Fonction	35
a) <u>CFTR, un canal Cl⁻</u>	<u>36</u>
Figure I6 : Représentation schématique du transport des ions Cl ⁻ dans une cellule épithéliale d'un épithélium sécréteur.	36
b) <u>CFTR, une protéine de régulation</u>	<u>37</u>
i) <i>ORCC</i>	37
ii) <i>ENaC</i>	38
iii) <i>ROMK</i>	40
iv) <i>Aquaporines</i>	41
v) <i>Echanges Cl⁻/HCO₃⁻</i>	42
c) <u>Autres fonctions</u>	<u>43</u>
i) <i>Trafic vésiculaire et fusion des endosomes</i>	43
ii) <i>Régulation du pH intracellulaire</i>	43
iii) <i>Rôle dans l'infection et l'inflammation</i>	44
iv) <i>Rôle dans les jonctions cellulaires</i>	44
5) Interactions avec d'autres protéines	45
a) <u>Interactions via la partie N-terminale</u>	<u>45</u>
b) <u>Interactions via la partie C-terminale</u>	<u>46</u>
Figure I7 : Alignement des séquences de la partie C-terminale de CFTR chez plusieurs espèces.	47
Figure I8 : Interactions régulant l'activité de CFTR à la membrane plasmique.	49
6) Régulation de l'activité canal Cl⁻	49
Figure I9 : Modèle de la régulation de l'ouverture et la fermeture ATP-dépendante du canal CFTR phosphorylé.	50
7) Dégradation	50
a) <u>Au niveau du RE</u>	<u>50</u>
b) <u>Endocytose et recyclage</u>	<u>52</u>

c) Rôle des protéines chaperonnes	53
Figure I10 : Principales chaperonnes impliquées dans l'ERQC.	53
i) HSP70	54
ii) HSP90	54
iii) CNX	55
Figure I11 : Cycle de la calnexine.	56
Figure I12 : Interaction entre CNX et CFTR.	58
E) La protéine CFTR-F508del	58
1) Modifications de la protéine CFTR mutée	58
a) Modifications topologiques	58
b) Modifications fonctionnelles	59
2) Biosynthèse de la protéine CFTR-F508del	59
Figure I13 : Processus de biosynthèse et de maturation de la protéine CFTR-F508del.	60
3) Maturation artificielle de la protéine CFTR-F508del	60
4) Localisation de la protéine CFTR-F508del	61
Figure I14 : Localisation des protéines CFTR sauvage et CFTR-F508del.	62
5) Dégradation de la protéine CFTR-F508del	63
a) La réponse UPR et la protéine CFTR-F508del	63
b) Les chaperonnes de l'ERQC et la protéine CFTR-F508del	65
c) Voies impliquées dans la dégradation des protéines CFTR	67
Figure I15 : Modèle des voies de dégradation majeures de CFTR sauvage et mutée F508del.	68
II) Les GTPases, ou protéines G	70
A) Les petites protéines G	70
Figure I16 : Cycle des protéines G monomériques.	70
B) Les grosses protéines G	71
Figure I17 : Transduction du signal par les grosses protéines G.	71
1) Les sous-unités G $\beta\gamma$	73
2) Les sous-unités G α	74
Figure I18 : Les classes de protéines G hétérotrimériques.	74
Tableau I1 : Classification des sous-unités α des protéines G.	75
a) La classe Gs	75
b) La classe Gi	76
c) La classe Gq	77
d) La classe G12	77
Figure I19 : Alignement des séquences de G α_{12} et G α_{13} et motifs consensus.	78
i) Localisation	78
ii) Activation	78
iii) Désactivation	79
iv) Fonctions	79
III) Les complexes jonctionnels	84
A) Généralités	84
Figure I20 : Organisation des structures d'adhérence intercellulaires.	84
B) La jonction serrée (TJ)	85
1) Présentation	85
Figure I21 : Organisation et principales molécules des jonctions serrées.	85
2) Principales molécules des jonctions serrées	86
a) Les claudines	86
b) L'occludine	86
c) Les JAM	87
d) La protéine ZO-1	87
C) La jonction adhérente (AJ)	88
1) Présentation	88
Figure I22 : La superfamille des cadhérines.	89
2) Les cadhérines classiques	90
a) Organisation et assemblage	90
Figure I23 : Représentation de cadhérines classiques.	91
b) Partenaires cytoplasmiques : les caténines	92
i) la β -caténine	92
ii) la γ -caténine	93
iii) La caténine p120	93

c) La E-cadhérine	94
d) La P-cadhérine	95
e) La N-cadhérine	96
Objectifs	97
Figure O1 : Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ agissent sur de nombreuses protéines.	99
Figure O2 : Rôle des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les complexes jonctionnels des cellules épithéliales rénales.	100
Matériel et Méthodes	101
I) Produits utilisés	103
II) Biologie moléculaire	105
A) Les plasmides utilisés	105
B) Méthodes courantes de biologie moléculaire	105
1) Purification de fragments d'ADN	105
2) Digestion	106
3) Ligation	106
4) Souche et culture bactérienne	106
5) Transformation bactérienne	107
6) Purification d'ADN plasmidique	107
C) Clonage par réaction de polymérisation en chaîne	108
Tableau M1 : Amorces utilisées pour le clonage de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.	108
D) Mutagenèse dirigée	108
Tableau M2 : Amorces utilisées pour la mutation de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.	108
Figure M1 : Principe de la mutagenèse dirigée.	109
E) Construction des outils moléculaires	110
Figure M2 : Constructions moléculaires réalisées.	110
III) Culture cellulaire	111
A) Les lignées utilisées	111
1) BHK-21	111
2) COS-7	111
3) COS-1	111
4) A549	112
5) 16HBE14o-	112
6) CFBE41o-	112
7) CFBE-wt	112
8) IB3-1	112
9) S9	112
10) HEK-293	113
B) Conditions de culture	113
C) Repiquage	113
D) Congélation	113
E) Déplétion en ATP et en GTP	114
1) Déplétion en ATP	114
2) Déplétion en GTP	114
Figure M3 : Mode d'action du MPA.	114
IV) Tissus bronchiques humains	115
V) Expression des protéines recombinantes	115
A) Transfections stables	115
1) Transfection stable au phosphate de calcium	115
2) Stabilisation des cellules transfectées : sélection par résistance aux antibiotiques	116
3) La cytométrie en flux	116
a) Le principe de l'analyse cytométrique	116
Figure M4 : Principe d'un cytomètre en flux.	117
b) Le protocole de l'analyse cytométrique	117
B) Transfections transitoires	117
VI) Mesure de la résistance transépithéliale	118

Figure M5 : Système de mesure de la RTE.	118
VII) Mesure de l'invasion bactérienne	118
Figure M6 : Schéma de l'infection de la monocouche de cellules épithéliales sur Transwell par <i>P. aeruginosa</i> exprimant la GFP.	119
VIII) Test de blessure	119
Figure M7 : Principe du test de blessure.	119
IX) Transfection des ARN interférents	120
Figure M8 : Principe de l'interférence par ARN.	120
X) Evaluation du niveau d'expression des ARNm	121
A) Extraction des ARN totaux	121
B) Transcription inverse des ARNm	121
C) PCR quantitative	122
1) Obtention des gammes étalon	122
Tableau M3 : Amorces utilisées pour les expériences de PCR quantitatives.	122
2) Détermination du niveau d'expression des ARNm	122
Figure M9 : Principe de la PCR quantitative.	123
XI) Imagerie	123
A) Immunolocalisation cellulaire	123
1) Principe général	123
Figure M10 : Principe de l'immunofluorescence indirecte.	124
2) Protocole d'immunomarquage	124
3) Microscopie à épifluorescence	124
4) Microscopie confocale	124
B) Immunohistochimie	125
Figure M11 : Principe de l'immunohistochimie.	126
C) Proximity Ligation Assay	127
Figure M12 : Principe du « proximity ligation assay ».	127
XII) Techniques biochimiques	128
A) Méthode de perméabilisation cellulaire et blocage par anticorps	128
B) Extraction protéique	128
C) Immunoprécipitation	129
D) Fractionnement subcellulaire	129
1) Centrifugation différentielle	129
2) Fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose	131
E) Spectrométrie de masse	132
F) Mesure de l'activité GTPasique	132
Tableau M4 : Composition du tampon de mesure de l'activité GTPasique.	132
G) Dosage protéique	133
H) Electrophorèse et immunodétection	133
Tableau M5 : liste des différents anticorps utilisés pour l'étude et de leurs fournisseurs.	134
I) Marquage métabolique au soufre 35	134
1) Présentation	134
2) Protocole	134
XIII) Statistiques	135
Résultats	137
I) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de la protéine CFTR sauvage et mutée	139
A) Identification d'une voie de dégradation dépendante du GTP	139
1) Mise en évidence dans les cellules BHK	139
Figure 1 : Effet de l' AlF_4^- et du MPA sur la dégradation de CFTR sauvage et mutée F508del.	140
2) Mise en évidence dans les cellules épithéliales bronchiques humaines	141
Figure 2 : Effet de l' AlF_4^- et du MPA sur la stabilité de CFTR sauvage et mutée dans les cellules HBE et CFBE.	142
B) La voie de dégradation dépendante du GTP est localisée au niveau du RE	142
Figure 3 : Rôle du GTP et des protéines périphériques du RE dans la dégradation de CFTR-F508del.	143

C) Identification et implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de CFTR mutée	144
Figure 4 : Implication des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la voie de dégradation dépendante du GTP.	145
D) Localisation réticulaire des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$	146
1) Caractérisation des différentes constructions des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$	147
Figure 5 : Expression des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sauvages et mutées.	148
2) Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont principalement localisées dans le RE	149
Figure 6 : Localisation des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.	150
E) Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ colocalisent avec la protéine CFTR sauvage et mutée	152
Figure 7 : Colocalisation de CFTR sauvage et mutée avec les protéines $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ et la CNX.	153
F) La protéine $G\alpha_{12}$, et non $G\alpha_{13}$, interagit avec les protéines chaperonnes CNX et HSP90	155
Figure 8 : Interaction des protéines CFTR sauvage, CFTR-F508del, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec les protéines chaperonnes HSP90 et CNX par immunoprécipitation.	156
Figure 9 : Interaction des protéines CFTR sauvage, CFTR-F508del, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec les protéines chaperonnes HSP90 et CNX par PLA.	158
G) La protéine $G\alpha_{12}$ stabilise la protéine CFTR mutée F508del	159
1) Expression transitoire	160
Figure 10 : Effet de l'expression de $G\alpha_{12}$ sur la quantité de CFTR-F508del exprimée de manière transitoire dans les cellules COS-7.	160
2) Expression stable	161
H) Implication de HSP90 et de la CNX dans la voie de dégradation dépendante du GTP	161
1) HSP90 stabilise les protéines $G\alpha_{12}$ et CFTR-F508del	162
Figure 11 : Effet de HSP90 sur la stabilité de $G\alpha_{12}$, CFTR-F508del et CFTR sauvage.	163
2) Une déplétion en GTP stabilise les protéines HSP90 et CNX	163
Figure 12 : Effet du GTP sur la stabilité des protéines HSP90 et CNX.	164
3) Le MPA et l' AIF_4^- stabilisent l'interaction entre CFTR-F508del et les protéines chaperonnes	165
Figure 13 : Effet d'inhibiteurs du protéasome, de l' AIF_4^- et du MPA sur la stabilité de l'interaction CFTR-chaperonnes.	165
II) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans le contrôle des jonctions intercellulaires : cas de la mucoviscidose	167
A) La résistance transépithéliale pulmonaire et la mucoviscidose	168
Figure 14 : Expression de CFTR et résistance transépithéliale des cellules HBE, CFBE et CFBE-wt.	169
B) Mauvaise organisation des jonctions cellulaires et stress du cytosquelette dans les cellules mucoviscidosiques	170
1) Organisation des jonctions cellulaires	170
Figure 15 : Organisation membranaire des protéines jonctionnelles et délocalisation de l'actine dans les cellules mucoviscidosiques.	171
2) Stress du cytosquelette	172
C) Expression différentielle des protéines jonctionnelles dans les cellules saines et mucoviscidosiques	172
Figure 16 : Expression des protéines jonctionnelles dans les cellules HBE, CFBE et CFBE-wt.	173
D) Expression différentielle des protéines jonctionnelles dans les tissus sains et mucoviscidosiques	174
Figure 17 : Expression des protéines jonctionnelles dans des tissus bronchiques sains ou mucoviscidosiques.	175
E) Les protéines ZO-1 et E-cad sont rapidement dégradées dans les cellules CFBE	176
Figure 18 : Stabilité des protéines E-cad et ZO-1 dans les cellules HBE, CFBE et CFBE-wt.	176
F) Implication des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$	177
1) Implication des protéines G hétérotrimériques	177
Figure 19 : Effet du MPA et de l' AIF_4^- sur le TER des cellules épithéliales.	178
2) Diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les cellules et tissus mucoviscidosique	178
Figure 20 : Expression des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les cellules et les tissus bronchiques sains et mucoviscidosiques.	179

Figure 21 : Expression et localisation des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les tissus bronchiques sains et mucoviscidiques.	180
3) Interaction avec ZO-1 et E-cad dans les cellules saines	181
a) <u>Colocalisation</u>	181
Figure 22 : Colocalisation des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec les protéines des jonctions cellulaires.	181
b) <u>Interaction</u>	182
Figure 23 : Interaction des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec les protéines jonctionnelles E-cad et ZO-1.	182
G) La diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ diminue la migration des cellules CFBE-wt	183
Figure 24 : Test de la blessure sur les cellules épithéliales rénales et bronchiques.	184
H) Une diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ diminue le TER et favorise l'invasion de l'épithélium bronchique par <i>P. aeruginosa</i>	184
A) Réduction du TER par une diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$	184
B) Test d'invasion épithéliale par <i>P. aeruginosa</i>	185
Figure 25 : Effet de la diminution d'expression de $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ sur le TER et la résistance à l'invasion par <i>P. aeruginosa</i> .	186
Discussion - Conclusions	187
I) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de la protéine CFTR sauvage et mutée	189
Figure D1 : Mécanisme possible de l'action de $G\alpha_{12}$ sur la stabilité de CFTR-F508del.	192
II) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans le contrôle des jonctions intercellulaires : cas de la mucoviscidose	194
Figure D2 : Mécanisme possible de l'action de $G\alpha_{12}$ sur la stabilité de CFTR-F508del.	196
Perspectives	199
I) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de la protéine CFTR sauvage et mutée	201
II) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans le contrôle des jonctions intercellulaires : cas de la mucoviscidose	202
Bibliographie	205
Annexes	233

Abréviations

°C = Degré Celsius
β-cat = β-caténine
μCi = MicroCurie
μM = MicroMolaire
Ω = Ohm
4PBA = Sodium-4-phénylbutyrate
ABC = ATP Binding Cassette
ABP = Avidine-Biotine-Peroxydase
ACVII = Adénylate Cyclase VII
ADN = Acide DesoxyriboNucléique
ADNc = ADN complémentaire
AE2 = Anion Exchanger 2
Aha1 = Activator of HSP90 ATPase 1
AJ = Jonction adhérente
AlF₄⁻ = Fluorure d'aluminium
AM = Anticorps Monoclonal
AMP = Adénosine mono-phosphate
AMPc = AMP cyclique
APC = Adenomatous Polyposis Coli
AQP = Aquaporine
AP-1 = Activator Protein 1
AP-2 = Activator Protein 2
ARN = Acide RiboNucléique
ARNm = ARN messenger
ASIP = Agouti Signaling Protein
ATF6 = Activating Transcription Factor
ATP = Adenosine TriPhosphate
BFA = Brefeldine A
BiP = Binding Ig Protein
BSA = Albumine de Sérum Bovin
Ca²⁺ = Ion calcium
CAL = CFTR Associated Ligand
CF = Cystic Fibrosis
CFBE = CFBE41o-
CFP = Cyan Fluorescent Protein
CFTR = Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHIP = Carboxyl terminus of Hsc70-Interacting Protein
CHOP = C/EBP Homologous Protein
CHX = Cycloheximide
CK = Cycle de Krebs
Cl⁻ = Ion chlorure
CNX = Calnexine
CO₂ = Dioxide de carbone
COPI = COat Protein I
COPII = COat Protein II
CRT = Calréticuline
CSK = Cytoskeletal
Csp = Cystein string protein
CT = Cycle Treshold
CTX = Toxine cholérique
Cyt = Fraction cytosolique
DAB = DiAminoBenzidine
DAG = DiAcylGlycérol
Dab2 = Protéine Disabled 2
DAPI = 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DEPC = DiEthylPyroCarbonate
DMSO = DiMéthylSulfOxide
dNTP = DésoxiriboNucléotides TriPhosphate
DO = Densité Optique
DPBS = Dubelco's Phosphate Buffer Saline

Abbreviations

E-cad = E-cadhérine
EBP50 = Ezrin Binding Protein 50 kDa
ECL = Enhanced ChemiLuminescence
EDEM = ER Degradation-Enhancing 1,2-Manosidase-like protein
EDTA = Acide Ethylène Diamine Tétracétique
eIF2 α = Eukaryotic Initiation Factor 2 α
EMT = Epithelial Mesenchymal Transition
ENaC = Epithelial Na⁺ Channel
Endo F (ou PNGase F) = Peptide N-Glycanase F
Endo H = Endoglycosidase H
EPAC = Exchange Protein directly Activated by cAMP
ERAD = Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERC = Endosomal Recycling Compartment
ERGIC = ER/Golgi Intermediate Compartment
ERM = Domaine de fixation Ezrine/Radixine/Moesine
ERQC = Endoplasmic Reticulum Quality Control
ESAM = Endothelial cell-Selective Adhesion Molecules
FRAP = Fluorescence Recovering After Photobleaching
GA = Geldanamycine
GAP = GTPase Activating Protein
GAPDH = GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
GEF = Guanine Exchange Factor
GFP = Green Fluorescent Protein
GlcNAc = N-acétylglucosamines
GPI = Glycosyl-PhosphatidylInositol
GSK = Glycogene Synthase Kinase
GTP = Guanosine TriPhosphate
GTP γ S = GTP non-hydrolysable
GTP_{RS} = Système de régénération du GTP
H₂O = Eau
H₂O₂ = Peroxide d'hydrogène
HA = Hémagglutinine
HBE = 16HBE14o-
HSC = Heat Shock Cognate
HSP = Heat Shock Protein
Hz = Hertz
I = Ion iodure
IBMX = 3-isobutyl 1-méthylxanthine
IHC = ImmunoHistoChimie
IMP = Inosine MonoPhosphate
IMPDH = Inosine MonoPhosphate DésHydrogénase
IP = Immunoprécipitation
IP3 = Inositol triphosphate
IRE1p = Inositol-Requiring Enzyme
JAM = Junctional Adhesion Molecules
JMD = JuxtaMembrane Domain
kb = Kilo paire de Base
kDa = Kilo Dalton
KIR = K⁺ Inward Rectifier channel
Lac = Lactacystine
LARG = Leukemia-Associated RhoGEF
LB = Milieu Lysogeny Broth
LDH = Lactate DésHydrogénase
LEF = Lymphocyte Enhancing Factor
LPA2-R = Récepteur à l'acide lysophosphatidique de type 2
LSB = Laemmli Sample Buffer
Ly = Lysat total
M = Molaire
MDCK = Madin Darby Canine Kidney
MG = MG132

Mg²⁺ = Ion magnésium
Mic = Fraction microsomale enrichie en RE
Mics = Mic décapée
Mito = Fraction mitochondriale
ml = Millilitre
MLC = Chaîne légère de la myosine
MMP = Matrix MetalloProteinase
MOI = Multiplicity Of Infection
Mp = Protéines associées à la membrane des Mic
MPA = Acide MycoPhénolique
MV = Mucoviscidose
MVP = Major Vault Protein
MUPP1 = Multi-PDZ Protein 1
Na⁺ = Ion sodium
NADH = Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NBD = Domaine de liaison aux nucléotides
NES = Nuclear Export Signal
NFκB = Nuclear Factor κB
ng = NanoGramme
NGS = Sérum normal de chèvre
NHE-RF = Na⁺/H⁺ Exchanger - Regulatory Factor
NLS = Nuclear Localization Signal
Ny = Fraction nucléaire
Occ = Occludine
ORCC = Outwardly Rectifying Chloride Channel
PAGE = PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PAR-1 = Récepteur activé par la thrombine
PATJ = PALS1-Associated TJ protein
PBS = Phosphate Buffer Saline
PCR = Réaction de Polymérisation en Chaîne
PDI = Protein Disulfide Isomerase
PDZ = PSD-95/Dlg/ZO-1
PERK = Double-strand RNA-activated Protein kinase-like ER Kinase
PI3K = Phosphatidyl-Inositol 3'-Kinase
PKA = Protein Kinase A
PKC = Protein Kinase C
PLA = Proximity Ligation Assay
PLC = PhosphoLipase de type C
PMSF = PhenylMethylSulfonyl Fluoride
PNGase F (ou Endo F) = Peptide N-Glycanase F
PP2A = Protein Phosphatase 2A
PTX = Toxine pertussique
qPCR = PCR quantitative
R = Domaine Régulateur
RCPG = Récepteurs Couplés aux Protéines G
RE = Réticulum Endoplasmique
RGS = Regulator of G protein Signaling
Rib = Fraction ribosomale
RIPA = RadioImmunoPrecipitation Assay
RISC = RNA Induced Silencing Complex
RMA1 = RING finger protein with a Membrane Anchor 1
ROMK = Renal Outer Medullary K⁺ channel
ROS = Espèces réactives de l'oxygène
RTC = Complexe ribosome/translocon
RTE = Résistance TransEpithéliale
SDS = Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE = SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SNAP-25 = Synaptosomal-Associated Protein 25
SNARE = SNAREceptor
SOC = Milieu Super Optimized Culture

Abbreviations

SRP = Signal Recognition Particule
Sura = Suramine
SVF = Sérum de Veau Foetal
T_{1/2} = Temps de demi-vie
TA = Température Ambiante
TCA = Acide TrichloroAcétique
TCF = T-Cell Factor
TER = Résistance TransEpithéliale
TGN = TransGolgi Network
TJ = Jonction serrée
TMAO = TriMéthylAmine N-Oxide
TMD = Domaine transmembranaire
TRITC = Tetramethyl Rhodamine Iso ThioCyanate
UGGT = UDP-Glucose GlucosylTransferase
UPR = Unfolded Protein Response
UV = Ultra Violet
VAMP-2 = Vesicle-Associated Membrane Protein 2
VAP = VAMP Associated Protein
VTC = Vesicular Tubular Cluster
wt = Sauvage
XBP-1 = X-box Binding Protein 1
XMP = Xanthine MonoPhosphate
YFP = Yellow Fluorescent Protein
ZO-1 = Zonula Occludens 1

Introduction

I) La mucoviscidose

A) Historique

Avec une fréquence d'un porteur sain sur 25 adultes, la mucoviscidose (MV), ou fibrose kystique du pancréas, est la maladie génétique autosomale récessive la plus répandue dans les populations Caucasiennes (Girodon-Boulandet & Costa, 2005). A l'échelle mondiale, la MV touche en moyenne un enfant sur 2.500 naissances (Welsh *et al.*, 2001) (Fig. II). En France, l'incidence moyenne est de 1/4200, avec cependant une différence entre le nord-ouest (1/2.500) et le sud-est (1/10.000) (Girodon-Boulandet & Costa, 2005).

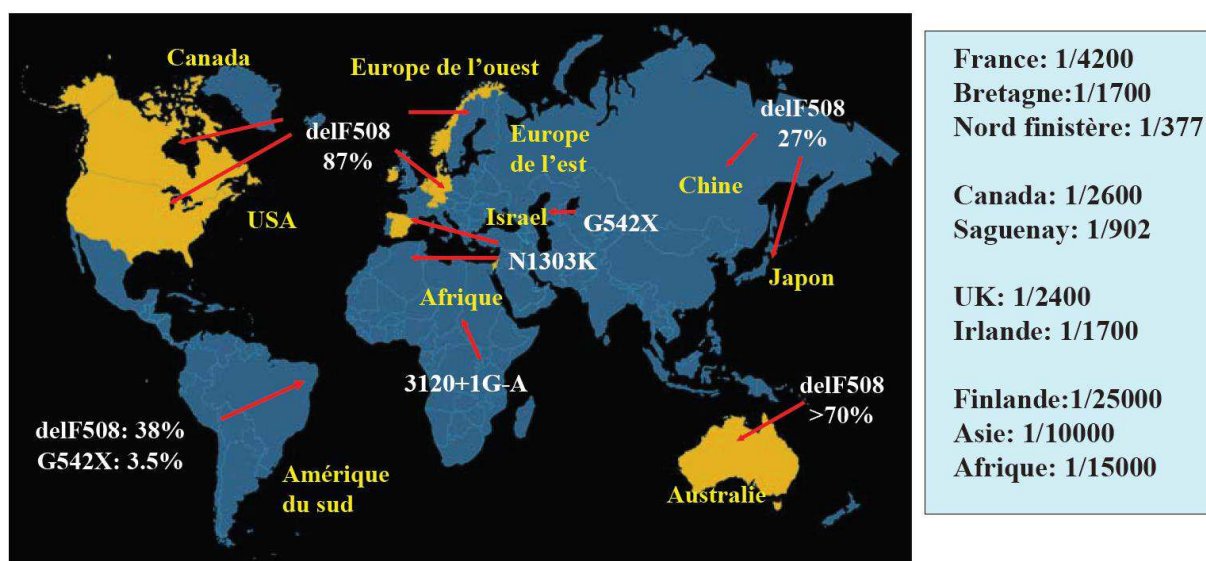


Figure II : Distribution géographique de la mucoviscidose.

Répartition géographique de la population mucoviscidosique. L'incidence moyenne dans la population mondiale est d'une naissance sur 2500 avec des variations géographiques et ethniques. Les régions les plus touchées sont représentées en jaune.

D'après F. Becq.

C'est en 1936 que le Dr. Guido Fanconi, un pédiatre suisse, décrit la mucoviscidose chez des enfants supposés atteints de maladie cœliaque et la nomme fibrose kystique du pancréas (Fanconi *et al.*, 1936). Deux ans plus tard, une pédiatre américaine, le Dr. Dorothy Hansine Andersen considère la maladie comme une entité à part entière (Andersen, 1938). Le Dr. Sydney Farber, trouvant la dénomination « cystic fibrosis » trop liée à un seul organe, sous-entendu le pancréas, fit référence à la maladie sous le nom de « mucoviscidosis » en 1943 pour rendre compte de l'état visqueux du mucus des patients (Farber, 1943).

Le mode de transmission est mis en évidence en 1946 par Andersen et Hodges qui avancent une transmission génétique autosomale récessive (Andersen & Hodges, 1946).

C'est en 1953 que le Dr. Paul di Sant' Agnese montre un déséquilibre électrolytique dans la sueur des malades mucoviscidosiques avec une teneur fortement augmentée en ions chlorures (Cl⁻) et sodium (Na⁺) (Darling *et al.*, 1953; di Sant'Agnese *et al.*, 1953). C'est grâce à cette découverte que le test de la sueur fera son apparition quelques années plus tard pour diagnostiquer les malades (Gibson & Cooke, 1959).

Le Dr. Paul Quinton, atteint de la mucoviscidose, sera le premier à montrer que l'augmentation des électrolytes dans la sueur est due à l'imperméabilité aux ions Cl⁻ dans les glandes sudoripares (Quinton, 1982, 1983).

B) Données cliniques

La MV est une maladie à atteinte polyviscérale touchant la plupart des organes possédant un épithélium, à savoir la peau, le système digestif, l'appareil reproducteur et les voies respiratoires (Fig. I2). L'atteinte des voies respiratoires constitue la principale cause de morbidité et de mortalité chez les malades. Le degré de sévérité de la maladie varie en fonction des mutations et des facteurs environnementaux (De Braekeleer *et al.*, 1997; Goss *et al.*, 2004).

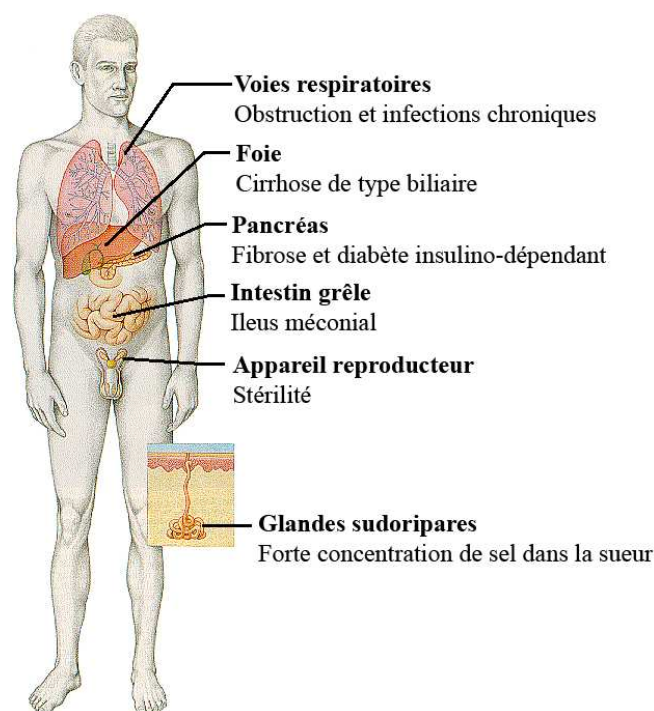


Figure I2 : La mucoviscidose, une maladie polyviscérale.

La mucoviscidose touche plusieurs organes, principalement les voies respiratoires.

D'après Welsh & Smith, 1995.

1) Atteintes pulmonaires

Les atteintes pulmonaires sont la cause de mortalité et de morbidité la plus importante dans la MV (Cystic_Fibrosis_Foundation, 2008). La déshydratation de la surface des voies aériennes mène à une perturbation de la clairance mucociliaire et par conséquent à une accumulation et à un épaississement du mucus à la surface des voies aériennes (Knowles & Boucher, 2002).

Cet épaississement du mucus combiné à l'infection bactérienne, principalement *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, va avoir pour conséquence une obstruction des voies respiratoires et l'installation d'une inflammation chronique exacerbée (Khair *et al.*, 1996; Moskowitz *et al.*, 2008). Ces facteurs seront la cause principale de la destruction des tissus pulmonaires qui sera associée à une insuffisance respiratoire, qui dans certains cas peut évoluer vers un cœur pulmonaire (Moskowitz *et al.*, 2008; Sharma, 2010).

2) Atteintes digestives

Le premier symptôme est l'iléus méconial, qui est une forme d'obstruction intestinale partielle ou complète résultant de sécrétions intestinales visqueuses (Eggermont & De Boeck, 1991). Ceci provoque des douleurs abdominales chroniques pouvant mener les malades à l'anorexie (Rosenstein & Langbaum, 1983).

Dans la MV, la perte de la fonction pancréatique survient dans les premières années de vie. Chez l'adulte, le mucus va obstruer les canaux pancréatiques et entraîner une fibrose du pancréas (Oppenheimer & Esterly, 1975). L'absence de sécrétion des enzymes digestives qui en résulte provoque une carence alimentaire en graisses, protéines, et vitamines liposolubles. Une supplémentation alimentaire doit alors être mise en place.

On observe aussi des atteintes hépatobiliaires pouvant évoluer en cirrhose biliaire qui constituent la seconde cause de mortalité des malades après les atteintes pulmonaires (Cystic_Fibrosis_Foundation, 2005).

3) Atteintes génitales

Plus de 95% des hommes atteints de MV sont infertiles. Cette infertilité est le résultat d'une azoospermie causée par une modification du canal déférent, qui peut être absent, atrophié, ou présentant une fibrose (Kaplan *et al.*, 1968; Holsclaw *et al.*, 1971). Les femmes sont en général fertiles, bien que quelques cas avec un mucus cervical anormal contribuant à une réduction de leur fertilité aient été rapportés (Oppenheimer *et al.*, 1970).

De plus, un retard de puberté responsable de la baisse de la fertilité a été observé chez les malades. Ce retard serait le résultat d'un dérèglement du système hormonal sexuel (Weyler *et al.*, 1999). Weyler et ses collaborateurs ont en effet montré que la protéine CFTR régule la sécrétion de gonadolibérine au niveau de l'hypothalamus (Weyler *et al.*, 1999). Cette hormone régule elle-même une voie de signalisation aboutissant au contrôle de la sécrétion des hormones sexuelles.

4) Atteintes endocrines

Un diabète insulino-dépendant est diagnostiqué chez 7% des malades âgés de 11 à 17 ans (Cystic_Fibrosis_Foundation, 2006). Il est dû à la fibrose du pancréas qui provoque sa destruction, incluant les cellules β productrices d'insuline dans les îlots de Langerhans (Lanng, 1996; Hardin *et al.*, 1997). 20% des malades de la MV atteints d'un diabète insulino-dépendant présentent des complications microvasculaires, à savoir des rétinopathies, neuropathies et néphropathies (Andersen *et al.*, 2006; Schwarzenberg *et al.*, 2007; van den Berg *et al.*, 2008).

5) Atteintes musculo-squelettiques

L'hippocratisme digital, une déformation des doigts et des ongles due, entre autres, à des maladies respiratoires chroniques, peut être rencontré chez les malades de la MV (Braude *et al.*, 1984). Jusqu'à 15% des patients peuvent développer une ostéoarthropathie hypertrophique impliquant la partie distale du fémur, du tibia, du péroné, du radius, de l'ulna et de l'humérus (Cohen *et al.*, 1986). Environ 23,5% des adultes atteints de MV souffrent d'ostéoporose et 40% d'ostéopénie (Neri *et al.*, 2006; Paccou *et al.*, 2010). Les causes principales de cette perte de densité osseuse liée à la MV sont une carence en vitamine D (89%), un diabète insulino-dépendant (53%), un indice de masse corporelle faible (39%) et une post-transplantation pulmonaire (25%) (Robertson & Macdonald, 2010).

L'ensemble de ces données anatomopathologiques nous montre toute la complexité des atteintes causées par la MV. Traiter un symptôme serait certes une avancée dans le traitement de la maladie mais d'autres symptômes prendraient tout de suite le dessus. La thérapie parfaite consisterait donc à viser tous les organes touchés.

C) Le gène *CF*

Le gène impliqué dans la mucoviscidose a été mis en évidence en 1989 par les équipes de Tsui, Collins et Riordan (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989). Il est localisé sur le bras long du chromosome 7, au locus q31 (Tsui *et al.*, 1985; Ellsworth *et al.*, 2000). Ce gène, comportant 27 exons, est appelé *Cystic Fibrosis* (*CF*) et code pour un ARN de 6,5 kb, dont 4,4 kb codent pour une glycoprotéine de 1480 acides aminés nommée Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

Aujourd'hui, plus de 1850 mutations sont recensés pour le gène *CF* (Cystic_Fibrosis_Mutation_DataBase_Statistics). Toutes ces mutations, en fonction de leur effet sur le comportement de la protéine CFTR, ont été classées en six classes (Fig. I3) (Welsh & Smith, 1993; Haardt *et al.*, 1999).

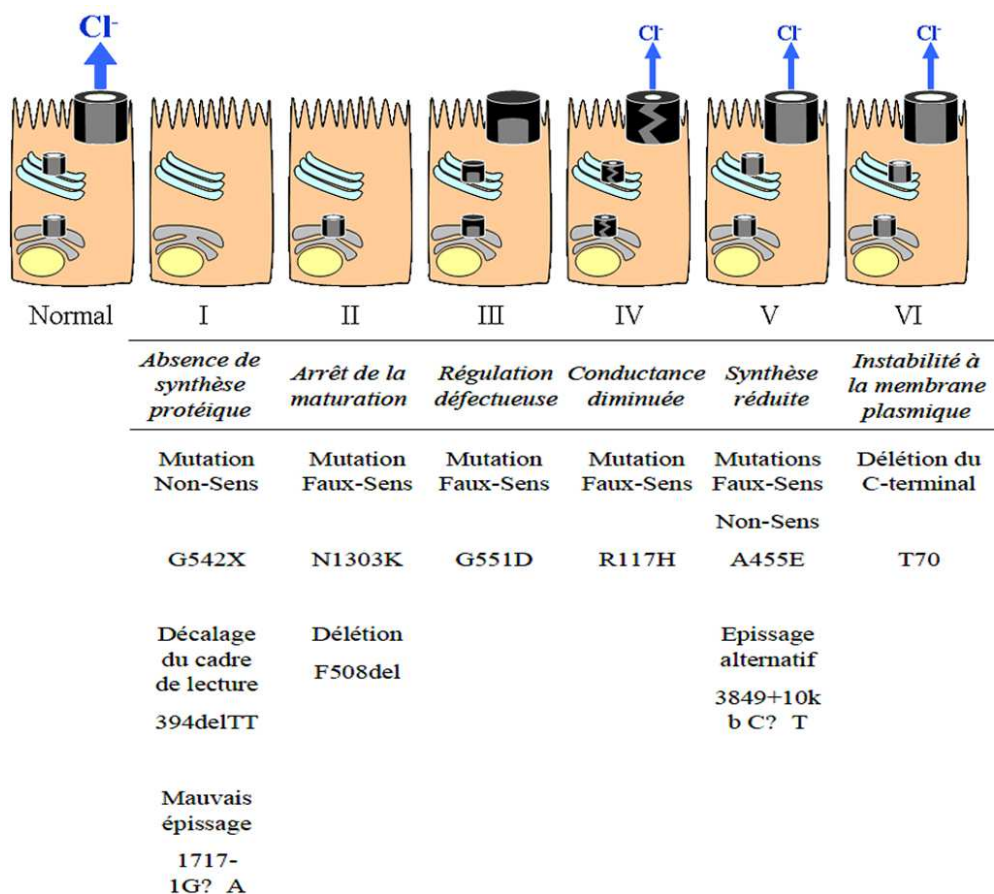


Figure I3 : Les différentes classes de mutations identifiées au niveau du gène *CF*.

Il y a 6 classes de mutations au niveau du gène *CF*. Chaque classe représente un effet différent sur le comportement cellulaire de la protéine CFTR.

D'après Durie et al., 1999.

1) Classe I : Mutations affectant la biosynthèse de la protéine CFTR.

Ces mutations impliquent une absence totale ou partielle de la protéine CFTR à la membrane apicale. Ceci peut être dû à l'apparition prématurée d'un codon stop dans la séquence (mutation non-sens, ex : G542X), à un décalage du cadre de lecture (ex : 394delTT), ou à des mutations entraînant un mauvais épissage de l'ARNm (ex : 1717-1G→A).

2) Classe II : Mutations entraînant un défaut de maturation de la protéine CFTR.

Dans ce cas, la protéine est synthétisée mais reste en grande partie séquestrée au niveau du réticulum endoplasmique (RE), où elle est rapidement dégradée (Cheng *et al.*, 1990; Ward & Kopito, 1994). Ce sont des mutations faux-sens où un acide aminé est substitué par un autre, comme pour la mutation N1303K, ou supprimé, comme pour la mutation F508del. Cette dernière, correspondant à la délétion de la phénylalanine en position 508, est la plus répandue chez les malades et représente environ 70% des allèles mutants du gène *CF* (Kerem *et al.*, 1989).

3) Classe III : Mutations ayant pour effet un défaut de régulation de la protéine CFTR.

Ces mutations affectent la plupart du temps les domaines de liaison aux nucléotides, dont le rôle est de réguler l'activité canal Cl⁻ de CFTR. La protéine est synthétisée et présente au niveau de la membrane apicale, mais ne peut pas être activée. Ces mutations sont des mutations faux-sens (ex : G1244E).

4) Classe IV : Mutations affectant l'activité de la protéine CFTR.

La majeure partie de ces mutations se situent dans les domaines transmembranaires de la protéine, essentiels à la formation du canal ionique. Ces mutations sont de type faux-sens (ex : G314E). La protéine est correctement localisée mais présente une activité pouvant être très réduite (Sheppard *et al.*, 1993).

5) Classe V : Mutations touchant la stabilité de l'ARNm.

Elles se situent sur le promoteur, les sites d'épissage, ou la partie codante du gène *CF*. La biosynthèse de CFTR est donc fortement réduite.

6) Classe VI : Mutations réduisant la stabilité de la protéine CFTR à la membrane plasmique.

Cette classe, qui est la dernière décrite, rassemble les mutations situées sur la partie C-terminale de la protéine CFTR. Ces mutations altèrent la stabilité de CFTR au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. La protéine a une activité normale et est correctement adressée à la membrane apicale, mais elle est rapidement internalisée, puis dégradée par les voies lysosomales et protéasomales (Haardt *et al.*, 1999; Benharouga *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2004).

D) La protéine CFTR

La protéine CFTR est une glycoprotéine de 1480 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 168 kDa (Riordan *et al.*, 1989). Elle appartient à la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Chez l'Homme, CFTR est classée dans la sous famille des ABCC et porte le nom de ABCC7 (Frelet & Klein, 2006).

Les transporteurs ABC sont très conservés. On les retrouve, en effet, chez les procaryotes comme chez les eucaryotes. Ils ont pour fonction de transporter de manière active des molécules telles des lipides, des protéines, des saccharides, des drogues ou des ions (Higgins & Linton, 2004; Gadsby *et al.*, 2006).

1) Biosynthèse et maturation

Les protéines membranaires sont toutes synthétisées au niveau du RE, compartiment primordial au repliement et à la maturation de ces protéines. L'action combinée de plusieurs protéines dites « chaperonnes » assure le bon repliement des protéines au niveau du RE. En effet, elles assurent le rôle de senseur du repliement dans ce compartiment (Gething & Sambrook, 1992). Pour la plupart d'entre elles, ces protéines chaperonnes s'associent à la chaîne polypeptidique naissante et l'aide au repliement tant que celui-ci n'est pas correct. La sortie du RE est alors régulée par un système de contrôle de qualité dénommé ERQC (Endoplasmic Reticulum Quality Control) qui empêche le trafic des protéines mal repliées et les dirige vers la dégradation (Ellgaard & Helenius, 2001).

a) Biosynthèse

La biosynthèse de la protéine CFTR se produit en 3 étapes. Tout d'abord, la transcription du gène *CF* en ARNm, puis l'épissage de cet ARNm, et pour finir, sa traduction

en protéine. Cette traduction a lieu au niveau des ribosomes se trouvant sur le RE. La séquence N-terminale de CFTR est linéaire et hydrophobe, elle est nommée peptide signal. C'est ce peptide signal qui va permettre l'ancrage du complexe ARNm/ribosome *via* le SRP (Signal Recognition Particule), formant ainsi le complexe ribosome/translocon (RTC). Le canal de translocation, constitué de plusieurs protéines, fixe ensuite le peptide signal. L'entrée de la chaîne polypeptidique dans le RE ne se fait que lorsqu'elle comporte au moins 70 acides aminés. La translocation de CFTR est alors initiée dans la lumière du RE, suivie par l'orientation des boucles cytoplasmiques et par l'insertion des segments transmembranaires dans la bicouche lipidique du RE (Sadlish & Skach, 2004).

Le repliement de la protéine CFTR s'effectuerait de manière co-traductionnelle puisque le domaine N-terminal acquiert une activité fonctionnelle alors que le domaine C-terminal est encore en cours de synthèse au niveau du ribosome (Chen *et al.*, 2000). Cependant, des études plus récentes favorisent l'hypothèse d'un repliement post-traductionnel (Chen *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2005). Lorsque le repliement de CFTR est achevé, elle acquiert la conformation de protéine canal par des modifications post-traductionnelles, ce qui lui permet de quitter le RE en cas de bon repliement, ou d'être dirigée vers la voie de dégradation protéolytique en cas de mauvais repliement. En effet, les nombreuses protéines chaperonnes présentes dans le RE et participant à l'ERQC, comme Bip, Grp94, ou encore la calnexine (CNX), sont capables de reconnaître les domaines protéiques naissants dans leur état provisoire, assurer leur bon repliement, et le cas échéant les reconnaître comme mal repliés et les diriger vers la dégradation.

b) Maturation

Dans le RE, la protéine CFTR va subir plusieurs étapes de glycosylation de manière co-traductionnelle. La séquence protéique de CFTR contient 2 sites potentiels de N-glycosylation : deux asparagines en position 894 et 900, présentes au niveau de la 4^{ème} boucle extracellulaire. Ceci rend possible la visualisation des différents « niveaux » de maturation de la protéine CFTR par migration sur gel SDS-PAGE et western-blot (Cheng *et al.*, 1990; Gregory *et al.*, 1990).

CFTR est en premier lieu synthétisée sous la forme d'un précurseur non glycosylé d'environ 130 kDa appelé forme A.

Cette forme A est alors rapidement glycosylée au niveau du RE pour donner naissance à la forme immature de 140 kDa nommée forme B, ou forme core-glycosylée. Pour cela,

l'oligosaccharide précurseur, une unité de 14 résidus glucidiques comprenant 2 N-acétylglucosamines (GlcNAc), 9 mannoses et 3 glucoses, est greffé à la chaîne polypeptidique naissante par l'oligosaccharyltransférase. Les deux glucoses terminaux sont alors immédiatement enlevés par l' α 1,3-glucosidase II et l' α 1,2-glucosidase I. Après un laps de temps durant lequel la protéine atteint un certain degré de repliement, le dernier glucose est éliminé par l' α 1,3-glucosidase II. Cette forme de la protéine, riche en mannoses, est sensible à l'Endoglycosidase H (Endo H) (Lukacs *et al.*, 1994; Ward & Kopito, 1994).

Les mannoses sont ensuite remplacés par des glucides complexes au niveau de l'appareil de Golgi. Cette dernière étape de glycosylation donne la forme C, forme mature, ou encore forme complexe-glycosylée de CFTR, de 170 kDa, insensible à l'Endo H, mais sensible à la Peptide N-Glycanase F (PNGase F ou Endo F).

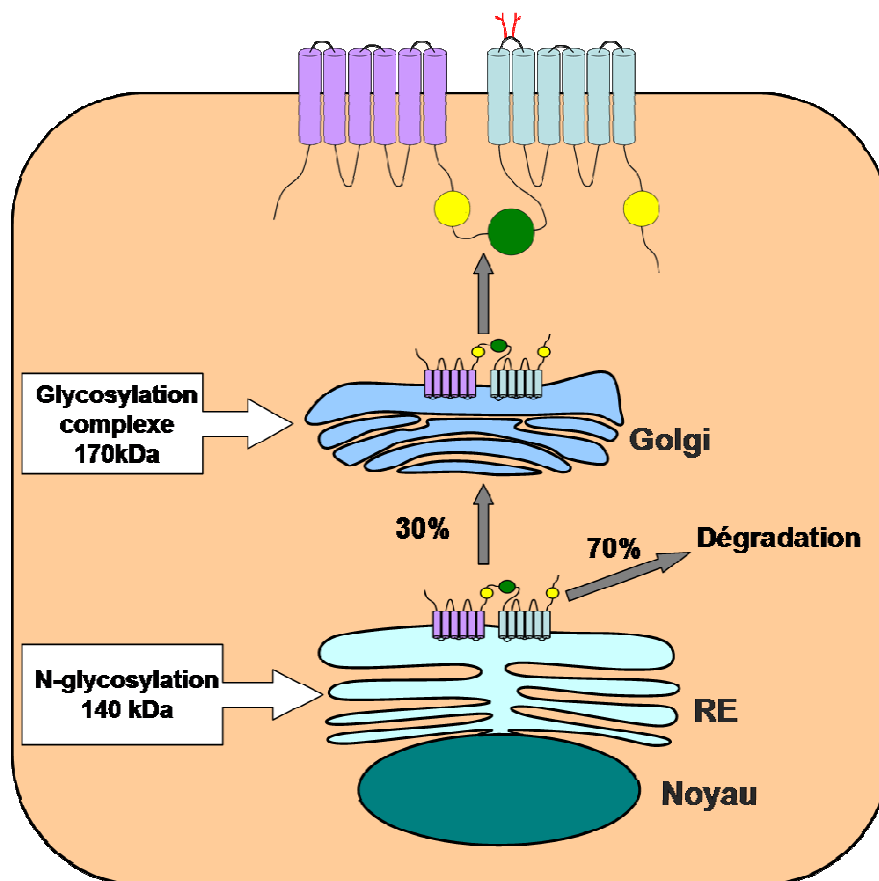


Figure I4 : Processus de biosynthèse et de maturation de la protéine CFTR.

70% des protéines CFTR nouvellement synthétisées sont séquestrées au niveau du RE, puis rapidement dégradées. Les 30% restants sont dirigés vers l'appareil de Golgi pour subir une glycosylation complexe, puis quitter l'appareil de Golgi pour la membrane plasmique.

La maturation de la protéine CFTR est un processus très inefficace. En effet, seuls environ 30% de la forme B sont capables de quitter le RE pour l'appareil de Golgi et ainsi

atteindre la forme C. Les 70% de la forme B restants sont séquestrés au niveau du RE et sont rapidement dégradés (Fig. I4). Le faible taux de maturation de CFTR semble être dû à un processus complexe de repliement impliquant de nombreuses interactions intra- et intermoléculaires. La forme immature de CFTR semble posséder une conformation altérée par rapport à la forme mature (Chen *et al.*, 2000).

Cette inefficacité de maturation semble être fortement dépendante de la lignée cellulaire dans laquelle est exprimée CFTR, et influencée par la surexpression de la protéine. En effet, Varga et collaborateurs ont démontré que l'efficacité du processus de maturation de CFTR peut avoisiner les 100% dans les cellules épithéliales Calu-3 et T84 exprimant constitutivement CFTR alors qu'il n'est que de 30% dans les systèmes d'expression hétérologues COS-7 et HeLa (Varga *et al.*, 2004).

Il est connu qu'un défaut de glycosylation peut sévèrement diminuer l'expression de protéines membranaires à la surface cellulaire, menant à des maladies graves telles qu'une rétinite pigmentaire, une hypoglycémie hyperinsulinémique persistante ou le syndrome de craniosténose (Conti *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2006). Le manque de glycosylation peut retarder le repliement correct de protéines en les empêchant d'interagir avec la CNX et/ou la calréticuline (CRT), et atténue leur stabilité dans de nombreux compartiments cellulaires, incluant la surface cellulaire (Melikian *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006). Mais la base moléculaire de ce défaut de stabilité des protéines membranaires mal repliées n'est pas encore connue. Bien qu'une N-glycosylation défectueuse altère le repliement et la stabilité de CFTR (Farinha & Amaral, 2005; Chang *et al.*, 2008), le niveau d'expression de la protéine CFTR complexe-glycosylée est légèrement réduit dans des cellules déplétées en CNX (Farinha & Amaral, 2005; Okiyoneda *et al.*, 2008; Rosser *et al.*, 2008), suggérant que le N-glycane ai un rôle intrinsèque dans la biogenèse du canal CFTR. Une étude récente montre qu'en plus de recruter la CNX et promouvoir le repliement de CFTR en cour de traduction, les core-glycanes ont un effet direct sur la maturation conformationnelle de CFTR dans le RE, et que les N-glycanes stabilisent la structure de CFTR (Glozman *et al.*, 2009). Cette même étude suggère un rôle direct des N-glycanes, indépendamment des chaperonnes, dans la vie cellulaire des protéines membranaires.

2) Structure prédite

Une structure 2D de faible résolution de CFTR est connue (Rosenberg *et al.*, 2004), mais sa structure 3D reste à déterminer.

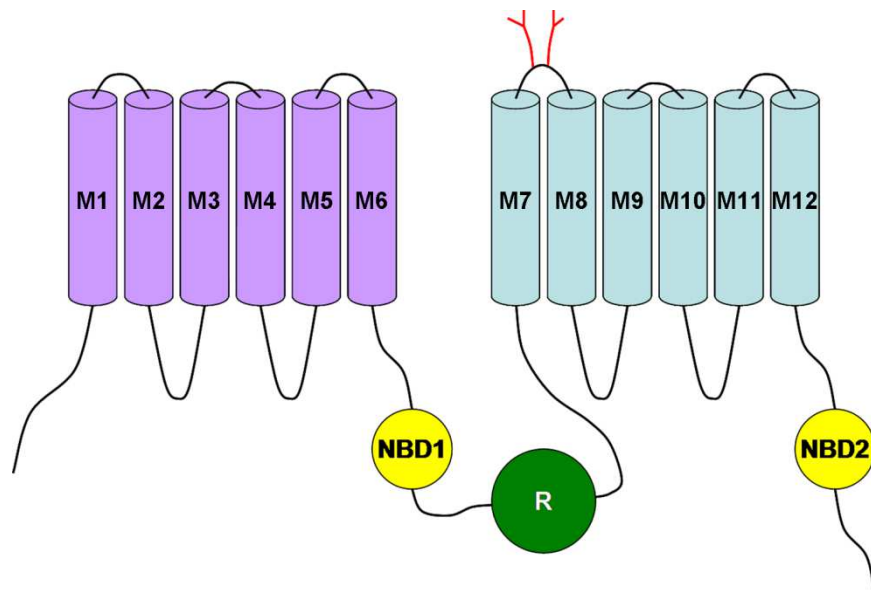





Figure I5 : schéma représentatif de la structure prédite de la protéine CFTR.

Les parties  et  représentent respectivement les domaines transmembranaires (TMD) 1 et 2. Le  représente la glycosylation au niveau de la 4^{ème} boucle extracellulaire. **M** indique le segment transmembranaire en hélice α . **R** représente le domaine régulateur. **NBD** (Nucléotide Binding Domain) 1 et 2 correspondent aux domaines de liaison et d'hydrolyse de l'ATP.

D'après Klein et al., 1999

En 1989, Riordan et ses collègues ont proposé une structure tertiaire pour la protéine CFTR en comparant sa séquence peptidique avec celle d'autres membres de la famille des ABC (Fig. I5). Selon cette structure, la molécule CFTR est composée de 5 domaines. Deux domaines hydrophobes transmembranaires, les domaines TMD1 et TMD2 (TransMembrane Domain), qui comportent chacun 6 segments transmembranaires en hélice α (M1 à M12), deux domaines de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, les domaines NBD1 et NBD2 (Nucleotide Binding Domain), et un domaine de régulation, le domaine R, possédant de nombreux sites de phosphorylation par les protéines kinases (PK) A et C (Riordan *et al.*, 1989; Riordan, 2005). La protéine CFTR possède aussi des sites de glycosylation présents sur le TMD2, entre les segments transmembranaires M7 et M8 (Fig. I5) (Chang *et al.*, 1994). A ce jour, malgré la présence de certaines structures de CFTR déterminées avec une faible résolution (2D), celle prédite en 1989 reste la plus acceptée et la plus utilisée pour l'interprétation de certains résultats biochimiques et fonctionnels (Riordan *et al.*, 1989).

En plus de la structure 3D, il existe aussi un débat concernant l'oligomérisation de la protéine CFTR. En 2001, Ramjeesingh et collaborateurs soutenaient l'hypothèse d'une dimérisation de CFTR (Ramjeesingh *et al.*, 2001), alors qu'au même temps les hypothèses du monomère et du multimère ont aussi été avancées (Chen *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004).

3) Transport intracellulaire

a) RE-appareil de Golgi

Les 30% de la protéine CFTR passant la barrière de l'ERQC sont transportés vers la membrane plasmique afin d'assurer la fonction de transport des ions Cl⁻. Pour cela, CFTR doit tout d'abord quitter le RE pour se rendre jusqu'à l'appareil de Golgi. L'export hors du RE se fait par l'intermédiaire de vésicules COPII (COat Protein II) qui bourgeonnent à partir de la membrane du RE (Schekman & Orci, 1996; Wang *et al.*, 2004). Elles sont composées de protéines recouvrantes Sec23p/Sec24p, Sec13p/Sec31p et de la GTPase Sar1 (Kuehn & Schekman, 1997). Ces vésicules COPII, une fois débarrassées de leurs protéines recouvrantes, fusionnent par la suite avec un complexe tubulo-vésiculaire appelé ERGIC (ER/Golgi Intermediate Compartment) ou VTC (Vesicular Tubular Cluster), situé du côté *cis* de l'appareil de Golgi (Aridor *et al.*, 1995). Ce complexe est caractérisé par la présence d'une protéine transmembranaire non glycosylée de 53 kDa : ERGIC53 (p53/p58), protéine de liaison aux vésicules impliquées dans le transport RE-appareil de Golgi de la majorité des protéines transmembranaires, de p63 et de la syntaxine 5 (Schweizer *et al.*, 1993; Pelham, 1997). Bien qu'une colocalisation ait été observée entre ERGIC53 et CFTR-F508del (Gilbert *et al.*, 1998), aucune interaction entre les protéines CFTR sauvage et ERGIC53 n'a été décrite.

Pour que CFTR puisse quitter le RE, il faut qu'une séquence signal d'export composée principalement de deux acides aspartiques situés en position 565 et 567 (**YK**D**AD**) et exposés à la surface de NBD1, soit reconnue par des membres du complexe COPII (Lewis *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). De plus, la mutation de la séquence **YK**D**AD** en **YKAAA** entraîne la rétention de CFTR dans le RE (Wang *et al.*, 2004). Riordan et collaborateurs ont aussi montré qu'il existe au niveau de CFTR des séquences de type **RXR** impliquées dans la rétention dans le RE des protéines mal repliées : ²⁹RQR³¹, ⁵¹⁶R^YR⁵¹⁸, ⁵⁵³RAR⁵⁵⁵ et ⁷⁶⁴RRR⁷⁶⁶ (Riordan *et al.*, 1989). Il semblerait que ces motifs empêchent le transport du RE vers l'appareil de Golgi, et la mutation de ceux-ci, particulièrement ²⁹RQR³¹ et ⁵⁵³RAR⁵⁵⁵, permet de restaurer ce transport (Chang *et al.*, 1999; Hegedus *et al.*, 2006). Il est probable que dans le cas de la protéine CFTR sauvage, ces sites soient masqués, alors que le mauvais repliement de la protéine CFTR-F508del rend ces sites accessibles.

Un transport rétrograde de CFTR de l'appareil de Golgi vers le RE *via* des vésicules de type COPI a aussi été mis en évidence (Bannykh *et al.*, 2000; Hegedus *et al.*, 2006).

Il existe en réalité deux voies d'adressage décrites pour l'export de CFTR du RE (Yoo *et al.*, 2002). La première, dite conventionnelle, est la voie classique d'acheminement de

CFTR à travers l'appareil de Golgi, qui consiste en un transfert progressif du compartiment *cis*- vers le compartiment *trans*-Golgi, avec au passage une glycosylation de type complexe (forme mature) (Wang *et al.*, 2004). La seconde, dite non conventionnelle, implique quant à elle un transport vésiculaire direct entre le RE et le compartiment *trans*-Golgien (Yoo *et al.*, 2002). Cette voie non conventionnelle est en accord avec l'observation de Bannykh et collaborateurs selon laquelle CFTR est faiblement accumulée dans l'appareil de Golgi (Bannykh *et al.*, 2000).

b) Appareil de Golgi-membrane plasmique

Le transport de la protéine CFTR de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique reste assez mal connu. Cependant, on sait qu'il nécessite des interactions protéine-protéine, particulièrement *via* la séquence DTRL se trouvant sur la partie C-terminale de CFTR et des protéines à domaine PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) (Cheng *et al.*, 2002). La compétition entre les protéines à domaine PDZ NHE-RF1 (Na⁺/H⁺-Exchanger Protein Factor) et CAL (CFTR Associated Ligand) semble être très importante. En effet, l'interaction entre CFTR et CAL favorise la séquestration de CFTR à l'intérieur de la cellule alors que son interaction avec NHE-RF1 favorise son adressage à la membrane plasmique (Cheng *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004). Cependant, d'autres études ont montré que l'absence de la séquence DTRL au niveau de la partie C-terminale de CFTR induit une dissociation des protéines NHE-RF1 et CFTR sans toutefois avoir d'incidence significative sur la localisation apicale de cette dernière (Benharouga *et al.*, 2003; Ostedgaard *et al.*, 2003).

Ces résultats suggèrent l'existence d'autres signaux que la séquence DTRL impliqués dans l'adressage de CFTR de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique.

4) Fonction

La protéine CFTR assure plusieurs rôles distincts. C'est un canal ionique permettant la sécrétion des ions Cl⁻ (Anderson *et al.*, 1991; Bear *et al.*, 1991; Tabcharani *et al.*, 1991), mais c'est aussi une protéine régulatrice de la fonction d'autres canaux ioniques (Schwiebert *et al.*, 1999; Barriere *et al.*, 2009). CFTR est aussi capable de transporter d'autres molécules et d'intervenir dans la régulation du pH intracellulaire (Barriere *et al.*, 2009).

a) CFTR, un canal Cl^-

Dans un épithélium sécréteur, l'absorption de Na^+ et la sécrétion de Cl^- sont les éléments majeurs de la fonction épithéliale. Dans ces épithélia, le flux se fait du pôle basolatéral vers la lumière. La force motrice nécessaire au transport secondaire actif d'ions Cl^- est produite par la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Les ions Cl^- entrent par la membrane basolatérale grâce à des co-transporteurs de type $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ et sortent du côté apical par diffusion passive à travers les canaux Cl^- (Fig. I6).

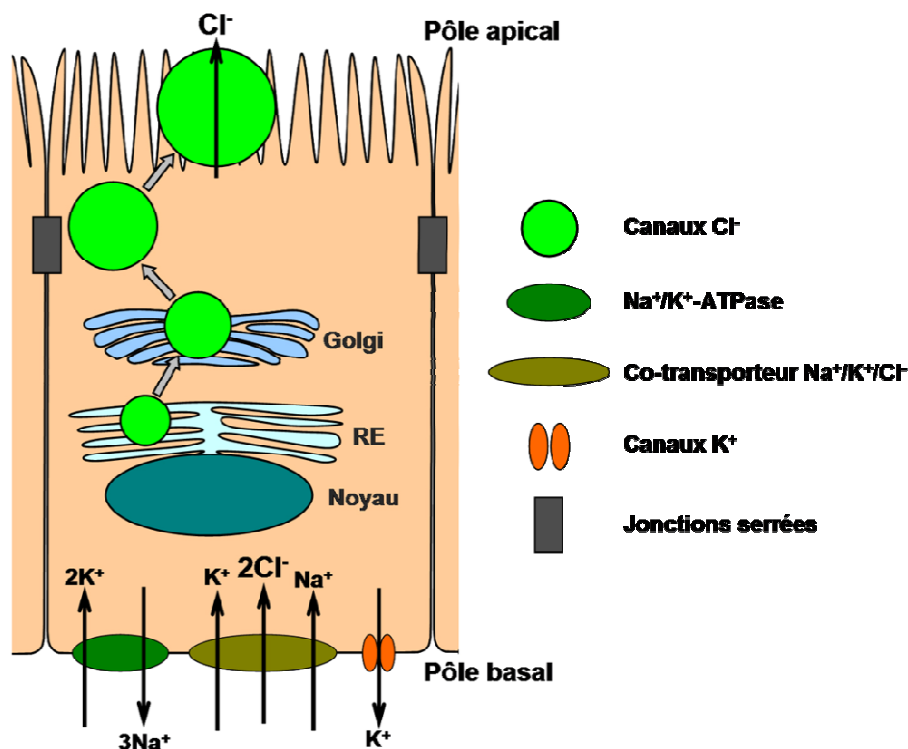


Figure I6 : Représentation schématique du transport des ions Cl^- dans une cellule épithéliale.

Les ions chlorures entrent dans la cellule par le pôle basal *via* le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ et en ressortent par le pôle apicale *via* les canaux Cl^- , comme CFTR.

Modifié d'après McCann & Welsh, 1990.

Parmi ces canaux, il y a la protéine CFTR, canal Cl^- localisé au niveau de la membrane apicale de plusieurs épithélia tels que l'intestin, les glandes salivaires, le pancréas et les voies respiratoires (Crawford *et al.*, 1991; Denning *et al.*, 1992b).

En 1983, Quinton a démontré que le transport d'ions Cl^- dépendant de l'AMPC et de la PKA n'est pas détectable au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales provenant de malades mucoviscidosiques (Quinton, 1983). Deux ans après la découverte du gène responsable de la MV, Anderson et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle de CFTR comme canal Cl^- sensible à l'AMPC en mutant les deux lysines (95 et 365) sensées

influencer la séquence de perméabilité aux halogénures (Anderson *et al.*, 1991). Bear et ses collaborateurs ont montré que la conductance unitaire du canal CFTR est d'environ 7 pS (Bear *et al.*, 1992).

La sélectivité ionique de CFTR est due majoritairement aux acides aminés chargés positivement présents dans les TMD1 et TMD6 (Akabas *et al.*, 1994; Cheung & Akabas, 1996, 1997; Akabas, 2000; Smith *et al.*, 2001; Linsdell, 2006). CFTR est très spécifique aux anions mais la sélectivité entre les halogénures est très faible et s'établit de cette manière : $\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ (Anderson *et al.*, 1991). CFTR a aussi été montré comme étant capable de laisser passer plusieurs anions simultanément, y compris des anions polyatomiques avec la séquence de perméabilité suivante : $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$ (Tabcharani *et al.*, 1993; Linsdell *et al.*, 2000). Le canal CFTR semble également être perméable au glutathion, un tripeptide impliqué dans la protection cellulaire contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Roum *et al.*, 1993; Kogan *et al.*, 2003).

b) CFTR, une protéine de régulation

Le nom « Transmembrane conductance Regulator » donné à la protéine CFTR était basé sur le classement de nombreuses anomalies au sein des épithélia mucoviscidiques, incluant une régulation altérée d'autres canaux Cl^- tel que l'ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) (Gabriel *et al.*, 1993) ou encore une hyperabsorption des ions sodium par le canal Na^+ sensible à l'amiloride, l'ENaC (Epithelial Na^+ Channel) (Knowles *et al.*, 1981; Quinton, 1983; Boucher *et al.*, 1986; Stutts *et al.*, 1995). La perte de l'activité de transport des ions Cl^- , qui pourrait être indirectement impliquée dans le transport d'eau et d'ions (Quinton, 1983; Anderson *et al.*, 1991; Bear *et al.*, 1991), n'étant pas suffisante pour expliquer les dysfonctionnements épithéliaux observés dans le cas de la MV, l'hypothèse d'une fonction régulatrice a été émise. Ces modèles de régulation par CFTR sont surtout basés sur son appartenance à la superfamille des ABC et sur sa capacité à fixer des protéines contenant des domaines PDZ (Short *et al.*, 1998).

i) ORCC

Il est bien établi, depuis 1983, que la MV est due en grande partie à un défaut de transport des ions Cl^- à travers les cellules épithéliales (Quinton, 1983). L'ORCC a été incriminé dans la maladie à cause de sa fonction canal Cl^- régulée par l'AMPc et du fait qu'il soit inactif chez les personnes atteintes de MV. En effet, l'ORCC est impliqué dans la

conductance membranaire et ne fonctionne qu'en présence de la protéine CFTR (Schwiebert *et al.*, 1994). CFTR régule l'ORCC *via* des kinases, par un mécanisme autocrine/paracrine qui implique le transport, contrôlé par CFTR d'ATP dans le milieu extracellulaire. L'ATP va alors se lier aux récepteurs purinergiques P2R pour stimuler l'ORCC (Schwiebert *et al.*, 1995). L'activité de l'ORCC est fortement augmentée en présence de PKA, de PKC et d'ATP, alors qu'il n'est pas directement activé par ces composés. La protéine CFTR fonctionnelle est donc très importante pour l'activité maximale de ce canal (Gabriel *et al.*, 1993; Jovov *et al.*, 1995; Schwiebert *et al.*, 1998). L'étude de la régulation de l'ORCC par différentes molécules CFTR tronquées a permis de montrer que les domaines de CFTR nécessaires au transport des ions Cl⁻ et à la régulation d'autres protéines ne sont pas les mêmes. En effet, la partie de CFTR composée de TMD1-NBD1-R (TNR-CFTR) a une perméabilité aux ions Cl⁻ et régule l'ORCC *via* l'export d'ATP, alors que le domaine TMD1 seul possède une activité canal Cl⁻ mais n'a pas d'activité régulatrice sur l'ORCC, ce qui laisse penser que ce sont les domaines NBD1 et R de la protéine CFTR qui seraient impliqués dans la régulation de l'ORCC (Schwiebert *et al.*, 1998). Il a été montré que le glibenclamide inhibe l'activité d'ORCC dans les patches excisés seulement quand CFTR est aussi exprimé (Julien *et al.*, 1999). L'hypothèse avancée est que le glibenclamide affecterait l'activité des transporteurs localisés autour de la protéine CFTR en se liant à cette dernière. Les ions Cl⁻ et le glibenclamide pourraient rentrer en compétition pour un même site (Sheppard & Robinson, 1997).

ii) ENaC

Le canal ENaC sensible à l'amiloride assure l'absorption des ions Na⁺ à travers la membrane apicale des cellules épithéliales. Dans les épithélia de malades de MV, l'absorption accrue d'ions Na⁺ est décrite depuis longtemps (Knowles *et al.*, 1983; Boucher *et al.*, 1986). L'absence de CFTR à la membrane apicale entraîne en effet une augmentation de l'absorption de Na⁺ sensible à l'AMPc. Ce phénomène est certainement dû à la levée de l'inhibition de l'ENaC par CFTR (Stutts *et al.*, 1995). Le canal ENaC est activé par l'AMPc et la PKA dans les cellules MDCK ainsi que dans les fibroblastes de souris. En revanche, il est insensible lorsqu'il est exprimé dans les ovocytes de Xénope, ce qui suggère que la régulation par l'AMPc nécessite des protéines régulatrices additionnelles. En revanche, si ENaC est co-exprimé avec la protéine CFTR, l'effet de l'AMPc est inversé, se traduisant par l'activation de CFTR tout en maintenant l'inhibition d'ENaC (Mall *et al.*, 1996; Chabot *et al.*, 1999). ENaC et CFTR étant naturellement co-exprimés dans les mêmes cellules épithéliales, la conductance

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 l'inversion du flux de NaCl. L'inhibition d'ENaC par CFTR dans les épithélia des voies respiratoires (Mall *et al.*, 1998) et du 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, quatre hypothèses existent :

- CFTR serait un partenaire d'interaction direct d'une ou plusieurs sous-unités d'ENaC. Des études de double hybride ont montré que la partie carboxy-terminale d'ENaC peut interagir avec les domaines NBD1 et R de CFTR (Kunzelmann *et al.*, 1997). Des expériences de troncation ont aussi démontré que NBD1 est essentiel à la régulation négative d'ENaC (Schreiber *et al.*, 1999a). De plus, l'interaction entre CFTR et ENaC est rompue par la mutation G551D, située dans le domaine NBD1 de la protéine CFTR (Stutts *et al.*, 1995).
- Comme dans le cas de la régulation d'ORCC, CFTR serait impliqué dans l'export de l'ATP intracellulaire. Ce dernier pourrait en effet inhiber le transport transépithélial de Na^+ par l'activation de la phospholipase C et de la PKC liée au récepteur purinergique P2R (Schreiber *et al.*, 1999a).
- Les canaux CFTR et ENaC n'interagiraient pas directement entre eux et la régulation se ferait par couplage électrochimique. L'activation de CFTR modifierait le potentiel membranaire, altérant le flux d'ions Na^+ (Nagel *et al.*, 2001).
- CFTR et ENaC interagiraient *via* des éléments associés à la membrane et au cytosquelette. C'est cette interaction indirecte qui permettrait à CFTR, *via* la PKA, d'interférer avec la régulation d'ENaC. Le mécanisme exact reste à déterminer mais 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. L'expression variable d'une protéine régulatrice ou d'une protéine liant CFTR ou ENaC au cytosquelette permettrait ainsi d'expliquer la régulation tissue spécifique d'ENaC par CFTR. L'actine pourrait être une de ces protéines (Schwiebert *et al.*, 1999). Une étude plus récente a conforté cette hypothèse en montrant, dans des cellules MDCKI

stablement transfectées par ENaC et CFTR, que CFTR régule non seulement l'activité d'ENaC mais aussi sa stabilité à la membrane plasmique (Lu *et al.*, 2007).

Si dans les épithélia respiratoires et intestinaux l'activité d'ENaC est inhibée par CFTR, des études ont montré que dans les glandes sudoripares, épithélium purement absorbant, l'activité d'ENaC dépend de CFTR et augmente avec l'activité de CFTR (Reddy & Quinton, 2003). Ni la phosphorylation, ni l'ATP, ne sont nécessaires à l'activation d'ENaC par CFTR mais cette activation requière la fonction canal Cl^- de CFTR. Les auteurs ont de plus démontré que l'activation d'ENaC n'est pas due à l'AMPc ou aux protéines G mais à la fonction canal Cl^- de CFTR (Reddy & Quinton, 2005).

Il semblerait donc que la direction du courant Cl^- influence le mécanisme d'interaction entre CFTR et ENaC puisque ENaC est activé lorsque les ions Cl^- sont absorbés, alors qu'il est inhibé lorsque les ions Cl^- sont sécrétés.

iii) ROMK

C'est une famille de canaux nommés KIR (K^+ Inward Rectifier channel) qui assure la sécrétion des ions K^+ . Elle comprend les canaux K_{ATP} , les canaux KIR6.x et les canaux rénaux ROMK (Renal Outer Medullary K^+ channel) 1, 2 et 3. Les canaux ROMK interviennent dans le recyclage du K^+ au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales rénales. Mais des canaux similaires ont aussi été retrouvés au niveau des voies respiratoires (Loussouarn *et al.*, 1996).

Un grand nombre de facteurs, tels le pH intracellulaire, les niveaux d'ATP intra- et extracellulaires et les molécules sulfonylurées (glibenclamide, tolbutamide), régulent l'expression et la fonction de ROMK. D'autres transporteurs ABC, les récepteurs aux sulfonylurées SUR1 et SUR2, confèrent généralement la sensibilité au glibenclamide du canal K_{ATP} et augmentent l'interaction ATP-dépendante entre les sous unités KIR6.x (Inagaki *et al.*, 1995).

Cependant, l'absence de sous-unité SUR dans le rein a suggéré la présence d'un autre élément régulateur pour ces canaux, probablement CFTR qui est surexprimé dans cet organe (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Benharouga *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 1996; Benharouga *et al.*, 1997). *In vitro*, des études suggèrent que CFTR est nécessaire à l'inhibition de ROMK par le glibenclamide et l'ATP cytosolique (Ruknudin *et al.*, 1998). Les études concernant l'effet de CFTR sur la fonction de ROMK laissent penser d'une part que cet effet nécessite le TMD1, le

NBD1 et le domaine R de CFTR (McNicholas *et al.*, 1996; Cahill *et al.*, 2000), et d'autre part que l'interaction de ces protéines se fait via des protéines à domaine PDZ, comme NHE-RF (Yoo *et al.*, 2004).

L'équipe d'Hebert a de plus démontré que la protéine CFTR située à la membrane plasmique confère la sensibilité de ROMK à l'ATP dans le rein de souris (Lu *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données permet de penser que l'interaction entre ROMK et CFTR est similaire à ce qui a déjà été observé pour les canaux K_{ATP} , à savoir un modèle général pour la régulation des canaux K^+ par les transporteurs ABC, avec comme différence que l'interaction entre ROMK et CFTR n'est pas directe mais fait probablement intervenir des protéines intermédiaires, comme NHE-RF (Lu *et al.*, 2006).

iv) Aquaporines

Les aquaporines (AQP) sont une classe de protéines membranaires, constituées de 6 hélices α transmembranaires, formant un pore facilitant le transport bidirectionnel de l'eau à travers les membranes (Agre, 2006). Les AQPs sont impliquées dans plusieurs fonctions de l'épithélium (Verkman, 2005). Une différence de perméabilité à l'eau après l'activation de CFTR par l'AMPc dans les ovocytes de xénope suggère que CFTR pourrait être impliqué dans la régulation d'un ou plusieurs canaux transportant l'eau (Schreiber *et al.*, 1997). La même équipe a montré deux ans plus tard que ce canal était l'AQP3 (Schreiber *et al.*, 1999b). Bien que dans l'épithélium pulmonaire, l'AMPc induise l'internalisation de l'AQP5, l'activation de la perméabilité à l'eau dépendante de CFTR n'a toutefois pas encore été démontrée dans les cellules des voies aériennes (Pietrement *et al.*, 2008).

L'AQP9 de l'épididyme de rat cotransfectée avec CFTR dans des ovocytes de xénope entraîne une augmentation de la perméabilité à l'eau, et il semble que le domaine NBD1 de CFTR soit essentiel à cette activité (Cheung *et al.*, 2003). Dans l'épididyme de rat, l'AQP9 colocalise avec CFTR et NHE-RF1 ; CFTR est par ailleurs un régulateur important de l'AQP9 et l'interaction entre CFTR, NHE-RF1 et AQP9 facilite l'activation de l'AQP9 par l'AMPc (Pietrement *et al.*, 2008). Les aquaporines 1 et 5 ont aussi été colocalisées avec CFTR dans les cellules pancréatiques humaines (Burghardt *et al.*, 2003) et dans les cholangiocytes (cellules hépatiques du canal biliaire) où AQP1 colocalise aussi avec l'échangeur d'anion AE2 (Anion Exchanger 2) (Banales *et al.*, 2006). Ces cellules épithéliales permettent la dilution et l'alcalinisation de la bile. CFTR jouerait donc un rôle important dans ces processus *via* son activation AMPc-dépendante, permettant la sécrétion de Cl^- et de HCO_3^- . En effet,

dans les cholangiocytes, l'AMPc induit un trafic coordonné de vésicules contenant AE2, AQP1 et CFTR vers la membrane luminale, assurant ainsi un mouvement passif d'eau et de bicarbonate (Banales *et al.*, 2006).

CFTR et les AQPs interagissent aussi dans l'épithélium de la cornée. Le transport de fluide implique généralement un transport secondairement actif de Cl^- créant le gradient osmotique nécessaire au transport transépithélial de l'eau (Hamann, 2002). Les profils d'expression de CFTR et des AQPs dans l'épithélium de la rétine et de la cornée laissent penser qu'elles sont impliquées dans la régulation du volume des fluides aqueux, des larmes, ainsi que de la pression locale (Da & Verkman, 2004). L'importance de CFTR dans le transport d'eau *via* les AQPs est confirmé par le fait que les patients mucoviscidosiques souffrent parfois d'œdèmes cornéens, d'altération de l'hydratation de la surface de l'œil, ou de décollement de la rétine (Castagna *et al.*, 2001). Reigada et Mitchell ont montré en 2005 que le canal CFTR est fonctionnel dans l'épithélium de la cornée et de la rétine (Reigada & Mitchell, 2005). La régulation de la sécrétion active des ions Cl^- et de l'absorption des ions Na^+ détermine la sécrétion d'eau et de larmes. Cependant, le mode d'interaction entre CFTR et les AQPs n'est pas encore bien défini. En plus de l'AMPc qui permet d'activer les AQPs et CFTR, des études ont démontré que les GTPases Rab peuvent moduler la fonction de CFTR, d'ENaC, et des AQP (Saxena & Kaur, 2006a, b; Saxena *et al.*, 2006a; Saxena *et al.*, 2006b).

v) *Echanges $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$*

Les ions bicarbonate (HCO_3^-) ont un rôle important dans le maintien du pH intracellulaire. La sécrétion de HCO_3^- peut être assurée par le couplage de CFTR et d'un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (ou d'un canal HCO_3^-) ou par CFTR lui-même (Seidler *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 2001). La protéine CFTR régule un échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dans les cellules surexprimant CFTR (comme les NIH-3T3 ou les HEK-293) ainsi que dans les tissus exprimant CFTR de manière endogène, comme les conduits pancréatiques, ou encore les duodéna de rat et de lapin (Lee *et al.*, 1999b; Lee *et al.*, 1999c; Choi *et al.*, 2001). Le canal CFTR a une conductance aux ions HCO_3^- et celle-ci est abolie lorsque CFTR est inactif ou absent de la membrane apicale (Reddy *et al.*, 2001). Ceci suggère un rôle des ions HCO_3^- dans la MV. L'absence d'alcalinisation du suc pancréatique conduisant à l'activation précoce d'enzymes digestives qui détruisent le pancréas, cela pourrait expliquer les insuffisances pancréatiques sévères présentes chez certains malades. Le HCO_3^- joue aussi un rôle majeur dans l'alcalinisation de la bile en étant sécrété par les cholangiocytes en réponse à la sécrétine.

Cette excrétion de HCO_3^- dans la bile entraîne un changement du pH intracellulaire, ce qui nécessite une régulation *via* des transporteurs ioniques, comme la protéine CFTR. Le glucagon, en se fixant sur son récepteur, induit une augmentation du niveau d'AMPc intracellulaire, ce qui active la PKA, qui à son tour stimule l'échangeur anionique AE2 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), permettant alors la diffusion d'eau *via* l'aquaporine. Le Cl^- importé dans la cellule est excrété par CFTR à travers la membrane apicale, ce qui permet le maintien du gradient de Cl^- et l'activation de AE2 (Banales *et al.*, 2006).

c) Autres fonctions

i) Trafic vésiculaire et fusion des endosomes

La protéinurie observée chez certains patients de la mucoviscidose pourrait être due à une mauvaise régulation de l'endocytose des récepteurs après fixation de leur ligand (Jouret *et al.*, 2007). Chez les patients de la mucoviscidose, l'ATP n'étant plus capable de stimuler la sécrétion de mucine dans l'épithélium, ceci va affecter la sécrétion vésiculaire ATP-dépendante de mucus dans des organes comme le pancréas (Montserrat *et al.*, 1996). De plus, l'expression et l'activation de CFTR favorisent la fusion des endosomes entre eux (Biwersi *et al.*, 1996). Ceci est dû au transport d'ions Cl^- , étant donné que la fusion est inhibée lorsque ces ions sont remplacés par du gluconate, anion non transporté par CFTR.

ii) Régulation du pH intracellulaire

Des travaux ont montré en 1991 que le pH à l'intérieure des organelles des cellules mucoviscidosiques est plus basique que celui des organelles des cellules saines (Barasch *et al.*, 1991; Elgavish, 1991). La protéine CFTR est en effet capable d'influencer le pH soit de manière directe, en acidifiant le pH de ces organelles, soit de manière indirecte, par l'intermédiaire d'échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de la famille SLC26 (Chang *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010). Ce rôle que joue CFTR dans le pH est particulièrement important lors d'invasions bactériennes. En effet, dans les macrophages, les phagosomes contenant les bactéries phagocytées fusionnent avec les lysosomes pour former le phagolysosome. Ici, les bactéries sont détruites par des enzymes dont l'activité est optimale dans un environnement acidifié par l'intermédiaire, entre autres, de CFTR. *A contrario*, les bactéries phagocytées ne sont pas lysées et prolifèrent dans les phagolysosomes des cellules malades (Di *et al.*, 2006; Swanson, 2006; Zhang *et al.*, 2010).

Ce phénomène a lieu dans les cellules épithéliales pulmonaires. En effet, à cause de l'absence d'un CFTR fonctionnelle, et par conséquent, une mauvaise régulation du pH, les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ne sont pas digérées, alors qu'elles le sont dans les épithélia sains (Jarry & Cheung, 2006; Kong *et al.*, 2006).

iii) Rôle dans l'infection et l'inflammation

Puisque la protéine CFTR joue un rôle dans l'acidification des organelles intracellulaires, nécessaire à l'élimination des bactéries, elle pourrait indirectement être impliquée dans le système immunitaire et dans le processus d'infection/inflammation observé chez les patients. En outre, il a été démontré par Pier et collaborateurs que CFTR fait office de récepteur pour les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhi* (Pier *et al.*, 1997; Pier *et al.*, 1998). Dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, son association avec CFTR entraîne le recrutement de la protéine MVP (Major Vault Protein) puis l'internalisation de la bactérie, ce qui provoque l'activation du facteur nucléaire NFκB (Nuclear Factor κ B). Ceci entraîne ensuite l'apoptose de la cellule infectée et l'élimination de l'infection bactérienne (Schroeder *et al.*, 2002). En revanche, chez les malades, cette cascade de réactions initiant la réponse immunitaire précoce est rompue, conduisant ainsi à la colonisation des voies aériennes par cette bactérie pathogène opportuniste (Cannon *et al.*, 2003).

De plus, il a été démontré que l'absence de CFTR entraîne une augmentation des céramides, conduisant à la production de ROS, reliant CFTR à l'inflammation (Zhang *et al.*, 2010).

iv) Rôle dans les jonctions cellulaires

A l'échelle cellulaire, la diminution de la résistance transépithéliale des épithélia pulmonaires est l'une des caractéristiques clé du développement et de l'aggravation de la mucoviscidose. En effet, la perte du complexe jonctionnel permet aux bactéries et à leurs toxines de franchir la barrière luminale et d'atteindre la membrane basolatérale où elles peuvent interagir avec plusieurs protéines membranaires (Lee *et al.*, 1999a). Cette entrée non contrôlée augmente le degré d'infection et engendre localement une exacerbation du processus de la réponse inflammatoire (Humlicek *et al.*, 2007).

La présence de la protéine CFTR à la membrane plasmique semble être requise pour une fonction contrôlée de la barrière épithéliale (LeSimple *et al.*, 2010). En effet, Le Simple et collaborateurs montrent que l'expression de CFTR sauvage dans des cellules MV permet de

restaurer la résistance transépithéliale et que des monocouches de cellules MV cultivées 24h à 29°C (condition utilisée pour restaurer le trafic cellulaire normal de la protéine CFTR mutée, F508del (Denning *et al.*, 1992a)) présentent une résistance transépithéliale qui augmente jusqu'à atteindre un niveau comparable à celui des cellules exprimant CFTR sauvage.

L'inhibiteur de CFTR, le CFTR_{inh}172, n'affecte pas la résistance transépithéliale des cellules traitées, suggérant que la modulation des jonctions cellulaires par CFTR ne dépend pas de son activité mais résulte plus probablement de sa localisation à la membrane et de son interaction avec des protéines situées à la périphérie cellulaire (LeSimple *et al.*, 2010).

La liaison de protéines à domaine PDZ immobilise CFTR et lui permet d'interagir avec d'autres composants de complexes macromoléculaires au niveau de la membrane apicale. Ce type d'interaction peut permettre à CFTR de se lier avec des protéines associées aux jonctions serrées comme la protéine à domaine PDZ ZO-1 (Wang *et al.*, 1998a) ou à des protéines régulatrices qui contrôlent l'assemblage de complexes jonctionnels (Zahraoui, 2004).

Il est intéressant de noter que CFTR module aussi la communication *via* les « gap junction » à travers un mécanisme impliquant la phosphorylation de tyrosines (Huang *et al.*, 2003).

5) Interactions avec d'autres protéines

a) Interactions via la partie N-terminale

La partie N-terminale de CFTR est capable d'interagir avec différentes protéines jouant un rôle important dans la régulation du canal CFTR.

Il existe une régulation de l'adressage de CFTR impliquant des protéines SNARE (SNAP REceptor), qui sont impliquées dans le trafic intracellulaire et en particulier la fusion vésiculaire (Söllner *et al.*, 1993). La syntaxine 1A, appartenant aux protéines SNARE, 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, ce qui a pour effet d'inhiber le courant Cl⁻ activé par l'AMPc (Naren *et al.*, 1997; Naren *et al.*, 1998). En effet, en se liant à la partie N-terminale de CFTR, la syntaxine A1 romprait les interactions inter-domaines de la protéine (notamment les interactions N-ter/R et N-ter/NBD1), nécessaires au bon fonctionnement du canal (Naren *et al.*, 1999).

Les résidus essentiels à l'interaction entre la syntaxine A1 et CFTR sont des acides aminés hydrophiles localisés dans le domaine H3 de la syntaxine : S225 et E238 (Ganeshan *et al.*, 2003).

La syntaxine 8, impliquée dans le trafic des endosomes précoces vers les 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.*, 2004).

La protéine Csp (Cystein string protein) est connue pour interagir et réguler l'association en complexe des protéines SNARE comme la syntaxine A1, la syntaxine 4 ou le VAMP. Les protéines Csp, CFTR et syntaxine A1 interagissent physiquement et fonctionnellement (Naren *et al.*, 1997; Chamberlain *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). Csp pourrait donc, par sa faculté à s'associer avec les protéines CFTR et SNARE, 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.

En 2007, une étude a démontré que la partie N-terminale de CFTR interagit aussi directement avec les filamines, qui sont des protéines impliquées dans le pontage des molécules d'actine, mettant en évidence un lien direct entre CFTR et le cytosquelette. Cette association entre CFTR et les filamines semble être impliquée dans la régulation de l'ancrage et de la stabilisation de CFTR à la membrane plasmique (Thelin *et al.*, 2007).

b) Interactions via la partie C-terminale

Les domaines PDZ sont des motifs d'environ 90 acides aminés permettant des interactions protéiques principalement avec le domaine C-terminal des protéines cibles et sont présents chez toutes les espèces. Ils régulent les interactions protéine-protéine, les clusters de protéines et la colocalisation de transporteurs, de canaux et de protéines de signalisation au niveau des 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 moésine (domaine ERM).

Le canal CFTR interagit avec de nombreux canaux et transporteurs qui régulent le canal au niveau de son expression, de son trafic ou de sa fonction. Le domaine C-terminal de CFTR possède une séquence consensus DTRL, située entre les résidus 1477 et 1480, et reconnue par des domaines PDZ (Short *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998a; Hegedüs *et al.*, 2003). Cette extrémité, très conservée chez les différentes espèces (Fig. I7), n'est pas indispensable à

l'activité canal Cl⁻ de CFTR mais l'est pour sa localisation apicale (Moyer *et al.*, 2000) et sa stabilité (Haardt *et al.*, 1999).

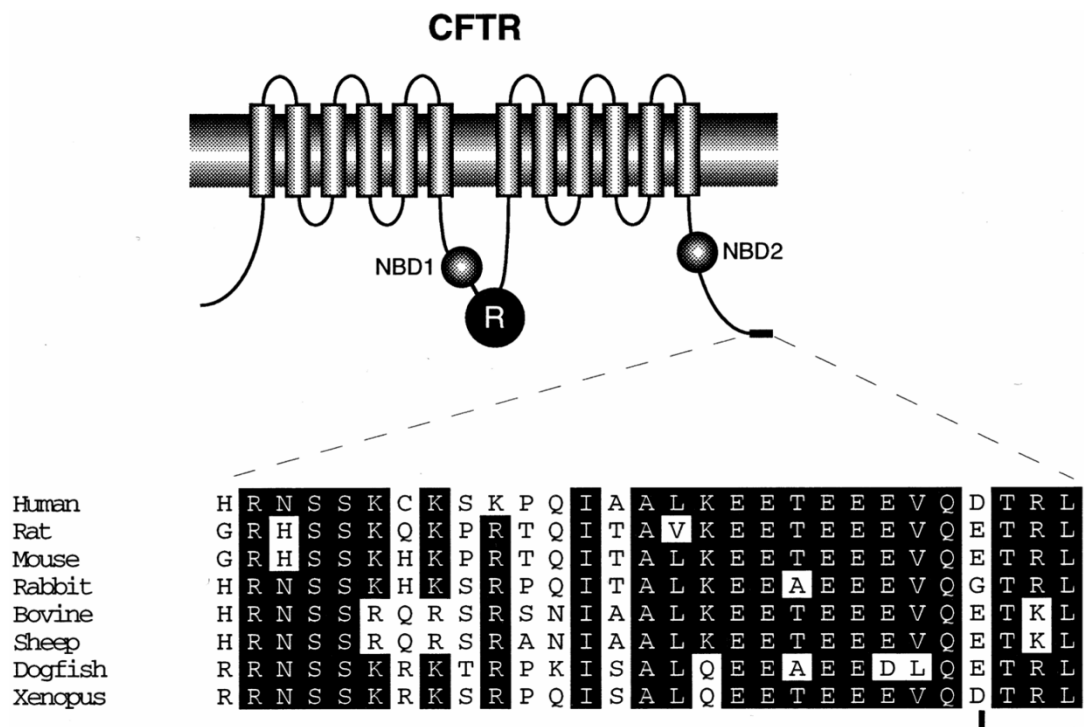


Figure I7 : Alignement des séquences de la partie C-terminale de CFTR chez plusieurs espèces.

Les 3 derniers acides aminés correspondent à la séquence consensus de liaison aux domaines PDZ.

D'après Wang et al., 1998a.

Les protéines associées à CFTR forment un complexe multiprotéique impliqué dans la régulation de CFTR (Guggino, 2004; Li & Naren, 2005; Riordan, 2005).

La première protéine à domaine PDZ à avoir été décrite comme interagissant avec CFTR est l'isoforme 1 du NHE-RF dont l'homologue humain est EBP50 (Ezrin Binding Protein 50 kDa) (Short *et al.*, 1998). NHE-RF1 et 2 possèdent, dans leur partie C-terminale, un domaine ERM se liant à l'ezrine, et permettant aux protéines liées à NHE-RF d'interagir avec l'actine au niveau de la partie apicale de la cellule. Il a été montré par des expériences de FRAP (Fluorescence Recovering After Photobleaching) que les domaines PDZ de NHE-RF 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 Cl⁻ de CFTR (Benharouga *et al.*, 2003). La présence de ce domaine PDZ laisse suggérer une possible dimérisation de CFTR *via* ce domaine. Cette dimérisation, induite par l'interaction entre CFTR et le complexe NHE-RF1/CAP70, semble améliorer la fonction canal Cl⁻ de CFTR (Wang *et al.*, 2000b; Raghuram *et al.*, 2001). Cependant, l'existence d'une forme dimérique de CFTR n'a pas été structurellement démontrée.

L'interaction entre CFTR et les protéines NHE-RF1 et 2 par l'intermédiaire de leurs domaines PDZ favorise une régulation réciproque des différentes protéines. Ainsi, par l'intermédiaire de NHE-RF1, CFTR interagit avec le récepteur β_2 -adrénergique (Naren *et al.*, 2003), et par l'intermédiaire de NHE-RF 2, CFTR interagit avec le récepteur à l'acide lysophosphatidique de type 2 (LPA2-R) (Li & Naren, 2005). Il a aussi été montré un couplage entre le transport d'AMPc par MRP4 et l'activité de CFTR dans l'épithélium intestinal, par l'intermédiaire de la protéine PDZK1/CAP70 (Li *et al.*, 2007). La partie C-terminale de CFTR est donc impliquée à la fois dans la régulation de la protéine elle-même et dans la régulation d'autres protéines.

L'interaction de CFTR avec les domaines PDZ de NHE-RF1 et CAL régule le niveau de CFTR à la membrane plasmique. Le trafic de CFTR vers la membrane nécessite la liaison de NHE-RF1 à la fois à la partie C-terminale de CFTR et à l'actine *via* l'eitrine (Swiatecka-Urban *et al.*, 2002). La compétition entre CAL et NHE-RF1 pour la fixation au motif DTRL de CFTR régule également le trafic du canal CFTR. 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 alors que cet effet peut être inversé par la surexpression de NHE-RF1 (Cheng *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004). Il a aussi été démontré que la compétition dynamique entre NHE-RF1 et la protéine Shank2 pour la fixation à la partie C-terminale de CFTR au niveau de la membrane plasmique pourrait être impliquée dans le maintien de l'homéostasie du transport épithélial d'ions et de fluides (Lee *et al.*, 2007). Deux études de 2007 ont mis en évidence le fait que NHE-RF1 serait impliqué dans la stabilisation de la protéine CFTR mutée F508del après correction de son défaut d'adressage. Mais cet effet n'est pas suffisant pour que la demi-vie de cette protéine à la membrane plasmique soit identique à celle de la protéine sauvage (Kwon *et al.*, 2007), bien qu'elle soit capable de corriger le défaut d'adressage de CFTR-F508del et donc de restaurer la conductance des ions Cl⁻ (Bossard *et al.*, 2007).

Il est fortement probable que la régulation de la phosphorylation de CFTR dépende de son interaction avec les protéines telles que PKA, PP2A (Protein Phosphatase 2A) et PKC au sein d'un complexe macromoléculaire formé par les interactions *via* les domaines PDZ (Fig. I8). Il a été montré par exemple que PP2A, impliquée dans la déphosphorylation du domaine R, se fixait à la partie C-terminale de CFTR par l'intermédiaire de la séquence DTRL (Thelin *et al.*, 2005).

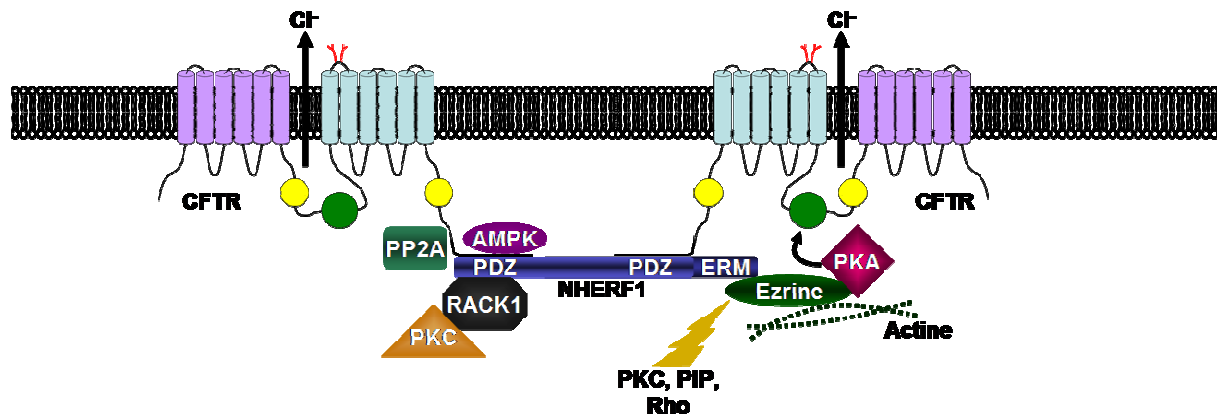


Figure I8 : Interactions régulant l'activité de CFTR à la membrane plasmique.

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 ; PIP2 : phosphatidylinositol biphosphate.

D'après Guggino & Stanton, 2006.

6) Régulation de l'activité canal Cl^-

L'ouverture du canal est régulée par des mécanismes de phosphorylation, de liaison, et d'hydrolyse d'ATP. A 37°C , la durée d'ouverture est comprise entre 100 et 250 ms. Plusieurs modèles de régulation du canal existent, mais le plus connu est certainement celui établi par Gadsby et son équipe, reposant sur des études structure-fonction, qui propose que des changements de conformation du domaine R par phosphorylation permettent le passage des ions Cl^- en levant l'état d'inhibition de l'interaction entre l'ATP et les domaines NBD (Gadsby *et al.*, 2006).

La première étape de l'activation consiste en une phosphorylation effectuée 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 canal détermine possiblement la probabilité d'ouverture, mais bien que les résidus phosphorylables du domaine R soient connus, ceux impliqués dans l'ouverture et la fermeture du canal restent incertains (Hwang *et al.*, 1994). *In vitro*, sur canal isolé, neuf résidus serines du domaine R sont phosphorylés par la PKA : 660, 670, 700, 712, 737, 753, 768, 795 et 813. Les cinétiques de phosphorylations sont aussi influencées par la proximité et l'activité des phosphatases endogènes de la cellule. Il a aussi été démontré que l'activation de la protéine kinase C (PKC) stimule la phosphorylation ultérieure de CFTR par la PKA (Tabcharani *et al.*, 1991; Yurko-Mauro & Reenstra, 1998). L'inactivation du canal se produit après déphosphorylation par des protéines phosphatases (Becq *et al.*, 1993).

L'inhibition des protéines phosphatases endogènes augmente l'efficacité de stimulation de CFTR et ralentit son retour à l'état inactif.

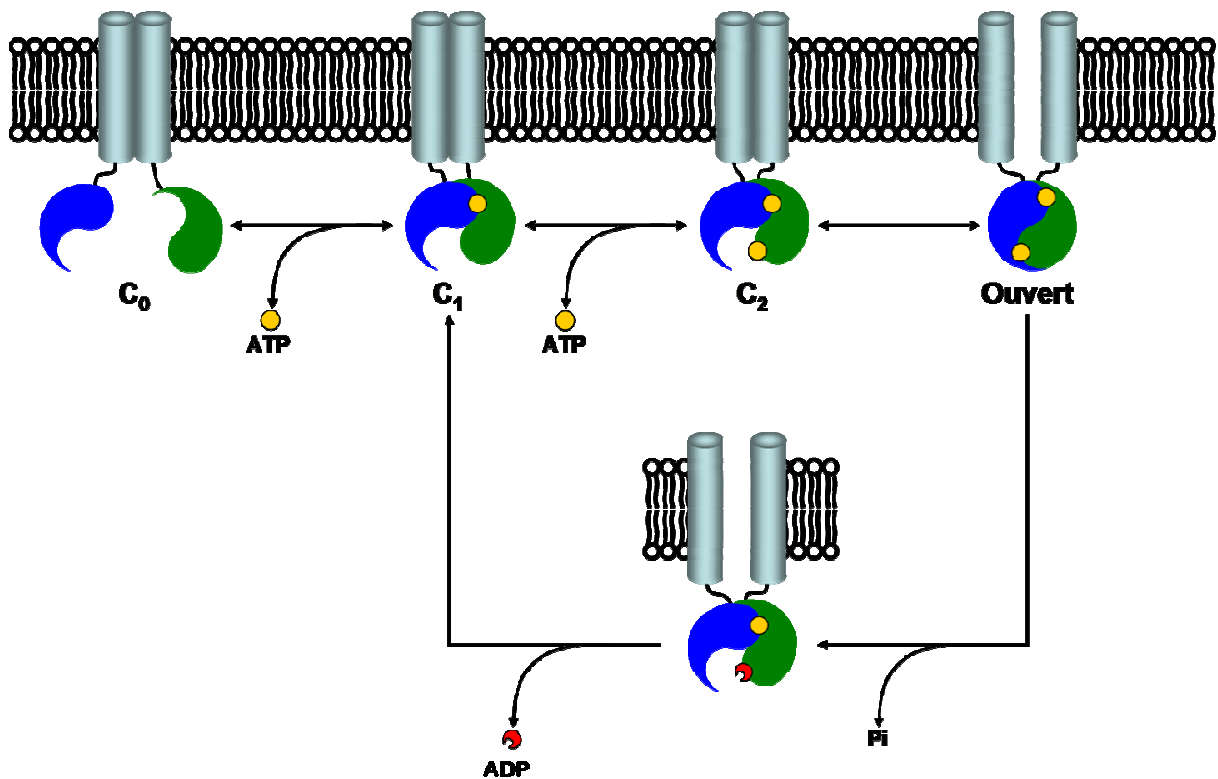


Figure I9 : Modèle de la régulation de l'ouverture et de la fermeture ATP-dépendante du canal CFTR phosphorylé.

Les TMDs sont représentés en bleu clair, NBD1 en bleu foncé et NBD2 en vert foncé. C₀ : CFTR au repos, C₁ : fixation d'ATP sur NBD1, C₂ : fixation d'ATP sur NBD2, puis dimérisation, ouverture du canal avant hydrolyse d'ATP par NBD2 et fermeture du canal (retour à C₁).

D'après Gadsby et al., 2006.

La deuxième étape de régulation consiste en la liaison et l'hydrolyse de l'ATP sur les NBDs, entraînant une modification conformationnelle des TMDs du canal. L'hydrolyse de l'ATP représente l'étape limitante à la fois pour l'ouverture et la fermeture du canal (Fig. I9) (Gadsby & Nairn, 1999). Dans des expériences de protéines 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).

7) Dégradation

a) Au niveau du RE

Comme précisé précédemment, seulement 30% des protéines CFTR synthétisées sont capable de quitter le RE pour se rendre vers l'appareil de Golgi. Les 70% restant sont séquestrés et dégradés au niveau du RE, principalement par le système ubiquitine/protéasome

(Lukacs *et al.*, 1994; Ward & Kopito, 1994; Gelman *et al.*, 2002). Les protéines néo-synthétisées sont tout d'abord contrôlées par le système ERQC composé de plusieurs protéines chaperonnes, dont les principales sont la calnexine et la calréticuline. Ces chaperonnes vont interagir avec les protéines pendant leur repliement co- et post-traductionnel pour éviter que des formes présentant un défaut de repliement ne quittent le RE (Pind *et al.*, 1994; Loo *et al.*, 1998; Ahner & Brodsky, 2004).

Les protéines reconnues comme mal repliées sont ensuite dirigées vers un autre système dénommé ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation), dont la principale fonction est la dégradation. Ce système, composé lui aussi de protéines chaperonnes dont HSP90, HSP70, HSC70 et la CNX, implique la rétrotranslocation de la protéine reconnue comme mal repliée vers le cytoplasme *via* le canal Sec61 pour qu'elle soit dégradée par le protéasome (Nakatsukasa & Brodsky, 2008).

Dans le cas précis de la dégradation de CFTR, la protéine chaperonne majoritairement impliquée est la CNX, qui retient CFTR dans le RE par une interaction prolongée qui permet le retrait d'un mannose de la forme immature par l'intermédiaire d'une mannosidase I (Pind *et al.*, 1994; Ward & Kopito, 1994). La perte de ce mannose constitue un signal de dégradation (Jakob *et al.*, 2001). La protéine ainsi déglycosylée est reconnue par une lectine se trouvant dans le RE, l'EDEM (ER Degradation-Enhancing 1,2-Manosidase-like protein), qui constitue une interface entre la calnexine et l'ERAD. Par la suite, la protéine CFTR déglycosylée est transloquée par le canal Sec61, puis dégradée par le protéasome (Bebök *et al.*, 1998). Le rôle des protéines HSP70 et HSP90, impliquées elles aussi dans le système ERAD, est de faciliter la formation d'un complexe comprenant notamment CHIP, une E3 ubiquitine ligase, qui relie les HSP à la dégradation protéique (Meacham *et al.*, 2001; Younger *et al.*, 2004). Une fois ce complexe formé, la protéine CFTR, liée à HSP70, est polyubiquitinylée et dégradée par le protéasome (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995; Gelman *et al.*, 2002).

Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome, la lactacystine et le MG-132, ne suffit pas à inhiber entièrement la dégradation de la protéine CFTR (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995). Ceci suggère l'implication d'autres voies de dégradation de la protéine CFTR. Il a été montré que des cystéine-protéases pouvaient être impliquées (Stratford *et al.*, 2003). De même, Lukacs et collaborateurs ainsi que De Keukeleire et collaborateurs ont démontré que la déplétion en ATP, indispensable au bon fonctionnement du système ubiquitine/protéasome, n'a pas d'effet significatif sur la dégradation de CFTR, suggérant ainsi l'existence d'une voie de dégradation ATP-indépendante (Lukacs *et al.*, 1994; De Keukeleire *et al.*, 2008). Plus

récemment, une voie de dégradation de CFTR dépendante du GTP, et non de l'ATP, a été mise en évidence au niveau du RE (De Keukeleire *et al.*, 2008).

b) Endocytose et recyclage

A la suite des étapes de maturation et d'adressage, CFTR atteint la membrane plasmique où elle est rapidement internalisée (Prince *et al.*, 1994; Bertrand & Frizzell, 2003). Ce sont des vésicules à manteau de clathrine qui semblent assurer cette internalisation et diriger les protéines ainsi internalisées vers les endosomes (Lukacs *et al.*, 1997). Les équipes de Lukacs et Hu ont aussi mis en évidence le fait que des motifs di-leucine et tyrosine présents sur les domaines N- et C-terminaux de CFTR constituent un signal d'endocytose (Prince *et al.*, 1999; Weixel & Bradbury, 2000; Hu *et al.*, 2001). CFTR est recruté dans ces vésicules à manteau de clathrine grâce à l'aide du complexe qu'elle forme avec la myosine VI et la protéine adaptatrice Disabled 2 (Dab2) (Swiatecka-Urban *et al.*, 2002). Ce phénomène 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 de la membrane plasmique, telles que les complexes AP-1 et AP-2 (la sous-unité $\beta 2$ d'AP-2 se liant à la clathrine) (Bradbury *et al.*, 1994). AP-1 intervient dans le transport du TGN (TransGolgi Network) vers d'autres compartiments, comme les lysosomes. AP-2, quant à elle, intervient au niveau de la membrane plasmique. Il a été montré par des expériences de pull down que CFTR, par son côté C-terminal, se lie à la protéine AP-2, mais pas à la protéine AP-1 (Weixel & Bradbury, 2000). L'internalisation de CFTR est perturbée par l'inhibition de son interaction avec le complexe AP-2, ou encore par le masquage de son site de fixation sur la myosine VI (Weixel & Bradbury, 2000, 2001; Cheng *et al.*, 2004; Gentzsch *et al.*, 2004). Les protéines ainsi internalisées dans ces vésicules sont soit adressées à la voie de dégradation lysosomale, soit recyclées à la membrane plasmique. Ces dernières sont alors transportées vers le compartiment des endosomes de recyclage (ERC : Endosomal Recycling Compartment) (Mukherjee *et al.*, 1997). Il a été montré que CFTR peut entrer dans ce compartiment pour être par la suite recyclée à la membrane plasmique (Picciano *et al.*, 2003). Le temps de demi-vie de CFTR à la membrane étant assez court, ce phénomène de recyclage est indispensable pour pallier à l'internalisation constitutive de CFTR et ainsi augmenter la durée de son séjour à la membrane ($T_{1/2}=14$ à 18h) (Swiatecka-Urban *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2004). Rme-1 et Rab11, qui sont des GTPases effectrices des endosomes de recyclage,

pourraient jouer un rôle dans la régulation de la sortie de CFTR des ERC, en effet, leur surexpression induit l'accumulation de CFTR dans les endosomes (Gentzsch *et al.*, 2004).

c) Rôle des protéines chaperonnes

De nombreuses protéines chaperonnes sont impliquées dans les étapes de la « vie » de la protéine CFTR, de sa synthèse à sa dégradation, en passant par sa maturation. En effet, au cours de son repliement, CFTR se lie à plusieurs chaperonnes cytosoliques et résidentes du RE ainsi qu'à des enzymes, en particulier celles responsables des modifications des parties glycosidiques, appartenant au système ERAD (Pind *et al.*, 1994; Loo *et al.*, 1998; Brodsky, 2001; Ahner & Brodsky, 2004; Wang *et al.*, 2006). Le mécanisme de contrôle du repliement des protéines au niveau du RE, l'ERQC, implique de nombreuses chaperonnes et co-chaperonnes afin d'éviter l'agrégation et diriger les protéines non correctement repliées vers la dégradation (Meacham *et al.*, 2001). Les principales protéines chaperonnes interagissant avec CFTR sont HSP70, HSP90 et la calnexine (Fig. I10).

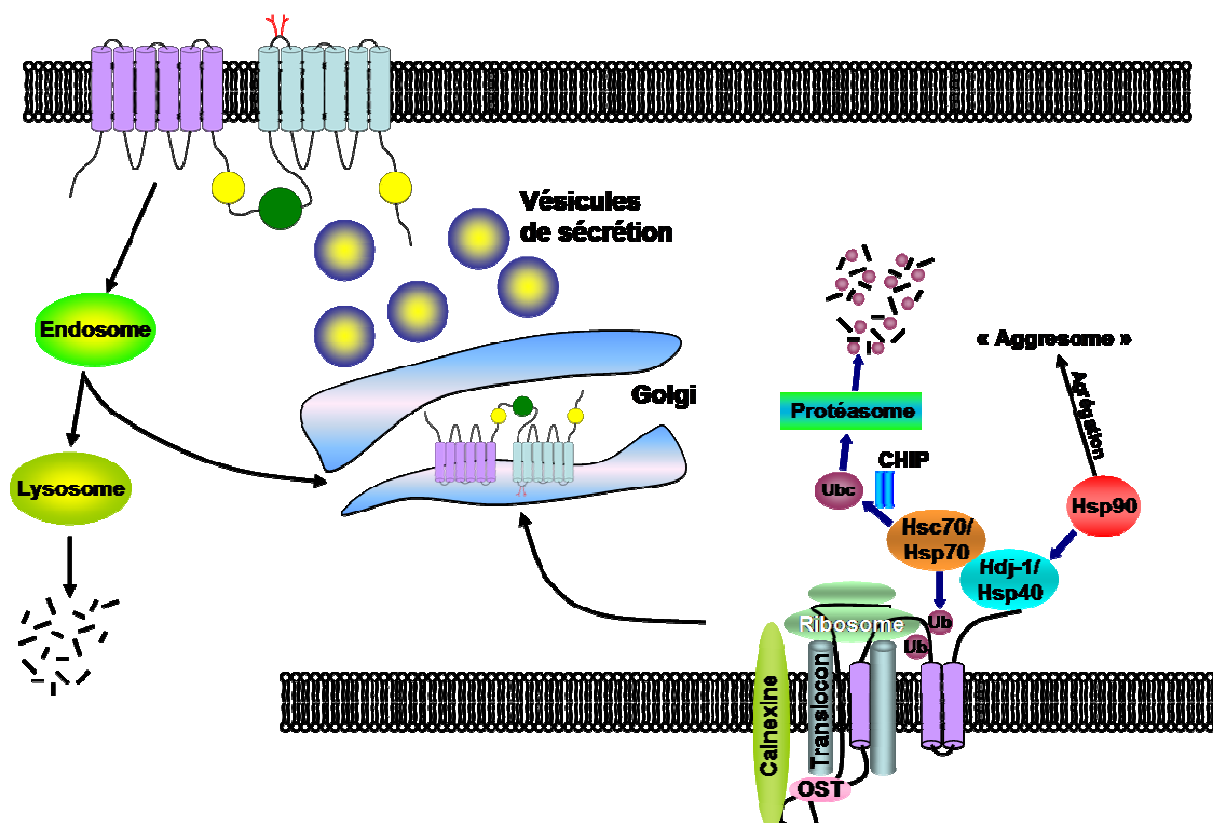


Figure I10 : Principales chaperonnes impliquées dans l'ERQC.

Plusieurs chaperonnes sont impliquées dans le repliement et le contrôle du repliement de la protéine CFTR. Hsp : « Heat shock protein » protéine inductible 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.

i) HSP70 (Heat Shock Protein 70)

La famille des protéines HSP70 est, comme son nom l'indique, constituée de protéines d'environ 70 kDa inductibles notamment par un choc thermique. Elle comprend entre autres la protéine co-chaperonne BiP (Binding Ig Protein). La protéine HSP70, impliquée dans le repliement protéique, a été décrite parmi les premières chaperonnes à interagir avec la protéine CFTR nouvellement synthétisée (Yang *et al.*, 1993). La protéine HSP70, en association avec HSP40 et d'autres co-chaperonnes (comme Hdj1/2, CHIP, HspBP1, ...), forme un complexe multiprotéique qui influence l'adressage des protéines vers leur voie de sécrétion, ou de dégradation. Il a été montré que l'interaction entre le domaine NBD1 de CFTR et la protéine HSC70 (Heat Shock Cognate 70), forme constitutive de HSP70, augmente l'efficacité de repliement du domaine et inhibe la formation d'agrégat (Strickland *et al.*, 1997). HSC70 interagit avec sa co-chaperonne Hdj-2 qui est localisée au niveau de la face cytosolique du RE. Ici, Hdj-2 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 au niveau du cytosol mais très réduit après l'expression du domaine R, interagirait avec CFTR au niveau du NBD1 afin d'empêcher son agrégation et ainsi faciliter la voie de repliement amenant à la formation d'un complexe intramoléculaire entre les domaines NBD et R de CFTR. La co-chaperonne CHIP (C-terminus of Hsc70 Interacting Protein) est colocalisée avec HSC70 et CFTR dans le RE. La surexpression de CHIP retiendrait CFTR dans le RE et faciliterait son ubiquitinylation et sa dégradation (Meacham *et al.*, 2001). Une autre co-chaperonne interagissant avec HSC70 et impliquée dans le processus de maturation de CFTR est la protéine Csp (Cystein String Protein). Cette dernière se lie à la partie N-terminale de CFTR et régule son transport ainsi que sa maturation (Zhang *et al.*, 2002). Il a aussi 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 effet en compétition pour se lier au domaine R de manière indépendante de HSP70. Elles agiraient donc comme des chaperonnes à part entière (Zhang *et al.*, 2006b).

ii) HSP90 (Heat Shock Protein 90)

La famille des protéines HSP90, comprenant par exemple la protéine GRP94, est constituée de protéines d'environ 90 kDa inductibles par un choc thermique. Elles jouent un rôle essentiel dans la prévention de l'agrégation et la dégradation des protéines mal repliées (Buchner, 1996; Schneider *et al.*, 1996). L'inhibition de HSP90 par la geldanamycine entraîne

un blocage de la maturation de CFTR et une accélération de sa dégradation par le protéasome, laissant supposer une implication dans la stabilisation de la protéine CFTR néosynthétisée (Loo *et al.*, 1998). De même, l'inactivation dans la levure des homologues de HSP90, à savoir HSP82 et HSC82, perturbe la stabilité de CFTR, appuyant le fait que HSP90 préserve CFTR dans un état correctement replié (Youker *et al.*, 2004). Dans la cellule, il semblerait que CFTR, non entièrement repliée, soit prise en charge par le complexe chaperonne/co-chaperonne HSC70, puis transférée vers le complexe HSP90 lorsqu'elle acquiert une conformation correcte, celle-ci empêchant l'agrégation de NBD1 (Wegele *et al.*, 2006). HSP90 possède aussi des co-chaperonnes comme la P23 et Aha-1, ce qui place HSP90 au centre d'un processus de décision concernant le devenir de CFTR (Fig. I10) (Wang *et al.*, 2006).

Aha1 (Activator of HSP90 ATPase 1) est la plus récente co-chaperonne de HSP90 identifiée et a été montrée comme accélérant considérablement l'activité de HSP90 *in vitro* (Panaretou *et al.*, 2002). Des études récentes suggèrent que des conformations différentes de HSP90 coexistent en absence de nucléotide, et que Aha1 peut largement influencer sa voie de signalisation même en absence d'ATP (Hessling *et al.*, 2009; Mickler *et al.*, 2009).

Wang et collaborateurs ont mis en évidence un rôle important d'Aha1 dans le mauvais repliement de CFTR (Wang *et al.*, 2006). En effet, cette étude montre que la stabilité et l'export de CFTR sauvage et muté F508del au niveau du RE sont sensibles au niveau d'Aha1, mais le mécanisme responsable de ce phénomène doit encore être élucidé. En 2010, Koulov et collaborateurs ont suggéré que Aha1 accélère l'hydrolyse de l'ATP par HSP90 (Koulov *et al.*, 2010). De plus, les auteurs démontrent que des mutations d'Aha1 influencent sa capacité à promouvoir le repliement de CFTR et son trafic jusqu'à la membrane cellulaire.

iii) CNX

Le couplage entre le repliement et l'ERQC à lieu immédiatement après le transport de la protéine en cours de synthèse dans la lumière du RE *via* le translocon. Le transfert de l'oligosaccharide précurseur (GlcNAc₂Man₉Glc₃) sur la chaîne polypeptidique croissante est la modification la plus commune. Pour les glycoprotéines, l'ERQC implique deux lectines homologues résidentes du RE. La CNX, une protéine transmembranaire, est une lectine réticulaire de 90 kDa (Wada *et al.*, 1991). La deuxième de ces lectines est une protéine soluble, la calréticuline (CRT). Ces dernières interagissent avec les N-glycanes N-liés monoglucosylés (GlcNAc₂Man₉Glc) après étalage du cœur oligosaccharidique par l'action de

l' α 1,2-glucosidase I (Hammond *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 1995; Ware *et al.*, 1995; Bergeron *et al.*, 1998).

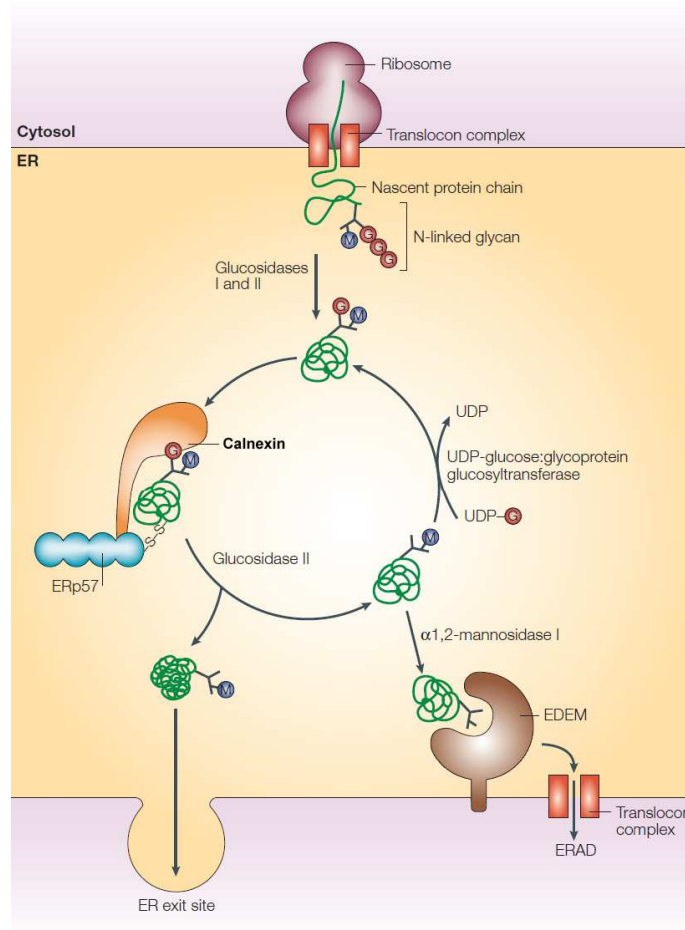


Figure I11 : Cycle de la calnexine.

La calnexine assiste le repliement des glycoprotéines dans le réticulum endoplasmique. Après le transfert de l'oligosaccharide cœur ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, où Glc est le glucose (cercles rouges), Man est le mannose (cercles bleus) et GlcNAc est le N-acetylglucosamine) à la chaîne protéique naissante, deux glucoses sont enlevés par les glucosidases I et II. Ceci génère une glycoprotéine monoglucosylée ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) pouvant interagir avec la calnexine. Cette chaperonne s'associe avec ERp57. ERp57 forme alors un pont disulfure (S-S) avec la glycoprotéine liée. Le clivage du glucose restant par la glucosidase II annule alors l'interaction avec la calnexine. Les glycoprotéines correctement repliées vont alors pouvoir quitter le réticulum endoplasmique alors que les protéines mal repliées vont devenir un substrat de l'UDP-glucose:glycoprotéine glucosyltransférase, qui va remplacer un glucose et permettre une autre interaction avec la calnexine. Si la protéine ne parvient jamais à se replier correctement, le résidu mannose (cercle bleu) est enlevé par l' α 1,2-mannosidase I. Ceci mène à une reconnaissance de la protéine par l'EDEM, qui sera ensuite dégradée par le système ERAD.

D'après Ellgaard & Helenius, 2003.

La CNX possède un domaine lectine pour lier le glycane et une boucle distincte impliquée dans l'interaction directe protéine-protéine (Schrag *et al.*, 2001). Cette chaperonne fixe également de l'ATP, du Ca^{2+} , du Zn^{2+} et interagit avec la co-chaperonne ERp57. Cette co-chaperonne est une thiol-oxydoréductase de la famille des disulfide-isoméras (PDI)

(Ellgaard & Helenius, 2001), qui sont 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, qui clive le dernier résidu glucose du glycane. Si la glycoprotéine atteint sa conformation native, elle n'est pas retenue dans le RE et est transportée vers l'appareil de Golgi où elle achève sa maturation. Si tel n'est pas le cas, un résidu glucose est ajouté sur le N-glycane par l'action de l'UDPglucose glucosyltransférase (UGGT) (Parodi, 2000). Ceci facilite à nouveau la liaison de la CNX et l'entrée de la glycoprotéine dans une voie de repliement appelée « le cycle de la calnexine » (Fig. II1) (Wada *et al.*, 1997; Zapun *et al.*, 1998).

Ce cycle se poursuit jusqu'à ce que la glycoprotéine acquiert sa structure native et soit exportée vers l'appareil de Golgi ou dirigée vers la dégradation.

Ainsi, le complexe formé par la CNX, la glucosidase II, l'UGGT, l'ERp57 et l'EDEM agit dans deux directions : augmenter l'efficacité de repliement et prévenir l'export d'une protéine mal repliée et/ou prématurément oligomérisée.

L'interaction entre la CNX et les protéines néosynthétisées se fait très tôt dans le processus de maturation co-translationnelle (Chen *et al.*, 1995). Son mode d'interaction avec CFTR sauvage de conformation intermédiaire reste encore mal défini. Cependant, des études ont montré que la CNX était associée de manière transitoire à la forme immature de CFTR sauvage, alors qu'elle restait associée plus longtemps à CFTR-F508del, jusqu'à sa dégradation par l'ERAD (Pind *et al.*, 1994; Ward & 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). Le choix du modèle cellulaire pourrait expliquer ces résultats contradictoires. En effet, une étude menée sur les cellules immortalisées d'un épithélium respiratoire a montré qu'en présence de castanospermine, la vitesse de dégradation de CFTR-F508del augmente, tout comme 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). Il a aussi été démontré que la surexpression de la CNX entraînerait aussi le blocage de CFTR sauvage dans le RE, en la protégeant de la dégradation. Il existerait donc deux points de contrôle au niveau du RE, dont l'un, indépendant de la CNX, prendrait en charge CFTR-F508del pour l'emmener vers la dégradation (Farinha & Amaral, 2005).

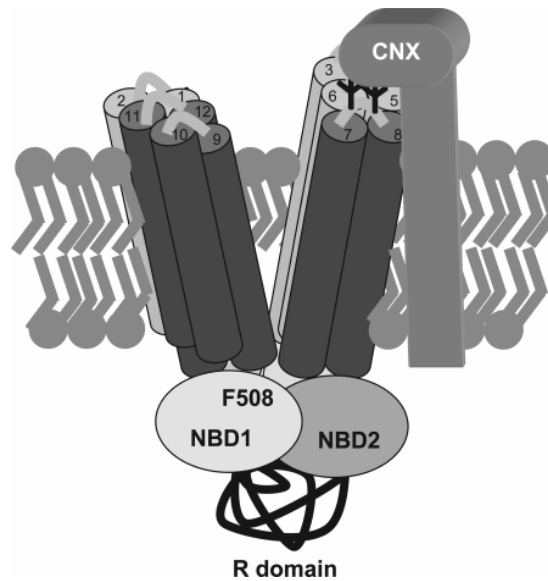


Figure I12 : interaction entre CNX et CFTR.

La calnexine (CNX) se lie à CFTR *via* le site de glycosylation présent dans la 4^{ème} boucle extracellulaire, entre les hélices transmembranaires M7 et M8. Il est proposé que cette liaison oriente les hélices 7 et 8 de CFTR dans le bon sens. Les hélices transmembranaires de CFTR sont représentées par des cylindres gris clairs pour le TMD1 et gris foncés pour le TMD2. Le numéro de l'hélice transmembranaire est indiqué sur le haut de chaque cylindre.

D'après Rosser et al., 2008.

Plus récemment, Rosser et collaborateurs ont mis en évidence que la CNX interagit avec les sucres de la boucle extracellulaire 4 sur le TMD2, ce qui stabilise ou oriente ce domaine et favorise son interaction avec le TMD1 (Fig. I12) (Rosser *et al.*, 2008).

E) La protéine CFTR-F508del

La mutation F508del, consistant en la délétion d'une phénylalanine en position 508 du domaine NBD1 de CFTR, représente environ 70% des mutations observées chez les malades (Kerem *et al.*, 1989). Cette mutation de classe II perturbe le repliement post-traductionnel de CFTR et entraîne son élimination rapide. En effet, à 37°C, la protéine CFTR-F508del est retenue dans le RE. Ce phénomène est responsable de l'absence de perméabilité aux ion Cl⁻ et de l'instauration, dans la membrane plasmique, d'une perméabilité excessive et non régulée aux ions Na⁺ (Berger & Welsh, 1991).

1) Modifications de la protéine CFTR mutée

a) Modifications topologiques

Les premières études ont montré que la mutation F508del causait une mauvaise configuration structurale du domaine NBD1, exposant ainsi certains motifs aux protéines

chaperonnes, entraînant la reconnaissance de la protéine CFTR mutée par l'ERQC, sa rétention au niveau du RE et sa dégradation rapide (Gelman *et al.*, 2002). Mais des études postérieures ont suggéré que la mutation F508del n'avait qu'un effet local sur le repliement de NBD1. En effet, cette mutation n'engendre pas de modification de la structure globale de NBD1, obtenue par rayon γ , sur des NBD1 purifiés (Lewis *et al.*, 2005), et n'altère pas son profil protéolytique (Du *et al.*, 2005). En revanche, la mutation F508del altère la stabilité de NBD2, probablement par un défaut d'interaction avec le domaine NBD1 (Du *et al.*, 2005).

La phénylalanine 508 est probablement impliquée dans des interactions hydrophobes qui sont critiques pour le repliement globale de la protéine (Strickland *et al.*, 1997), et pour la mise en place des hélices transmembranaires (Chen *et al.*, 2004), formant ainsi office un signal de reconnaissance pour le système ERAD. 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 CFTR mutée dans le RE et à sa dégradation. Ainsi, la mutation de quatre résidus arginine : R29, R516, R555 et R766 provoque l'adressage d'environ un tiers des protéines CFTR-F508del à la membrane plasmique où elles sont fonctionnelles (Chang *et al.*, 1999).

b) Modifications fonctionnelles

Lorsque la protéine CFTR-F508del est restaurée à la membrane plasmique à l'aide de chaperonnes chimiques dans les cellules mucoviscidiques, elle est fonctionnelle mais présente un défaut d'ouverture du canal (Dalemans *et al.*, 1991; Drumm *et al.*, 1991; Pasyk & Foskett, 1995; Sato *et al.*, 1996). En effet, 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). En configuration membrane excisée, des expériences de patch clamp ont montré que le canal CFTR-F508del présente, après phosphorylation, un taux d'activation sept fois plus faible que celui de CFTR sauvage (Wang *et al.*, 2000a).

2) Biosynthèse de la protéine CFTR-F508del

L'absence de protéine CFTR-F508del à la membrane plasmique peut provenir soit d'un défaut d'adressage de la protéine, soit d'une instabilité élevée à la membrane. Des expériences de marquage métabolique ont permis d'évincer une de ces hypothèses. En effet, seule la forme immature de CFTR-F508del est présente, indiquant qu'elle ne subit pas de

maturation, et par conséquent ne peut quitter le RE. Ceci laisse donc penser qu'il s'agit bel et bien d'un défaut d'adressage de la protéine (Wei *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2003).

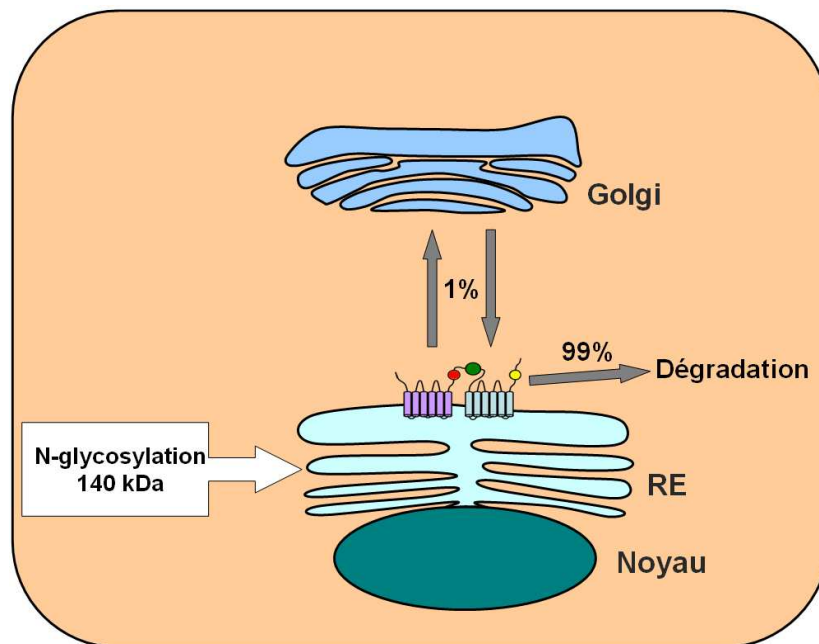


Figure I13 : Processus de biosynthèse et de maturation de la protéine CFTR-F508del.

1% des protéines CFTR-F508del nouvellement synthétisées effectuent des allers-retours entre le RE et le cis-golgi, les 99% restants sont séquestrées au niveau du RE, puis rapidement dégradées.

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

Tout comme la protéine sauvage, la protéine CFTR-F508del est synthétisée au niveau du RE sous la forme d'un précurseur de 140 kDa (Lukacs *et al.*, 1994). Elle contient alors une chaîne oligosaccharidique riche en mannose, la rendant sensible à l'endoglycosidase H, alors que la protéine CFTR sauvage acquière par la suite une résistance à cette endoglycosidase (Cheng *et al.*, 1990). La mutation F508del perturbe donc une étape de maturation de la protéine au niveau du RE.

3) Maturation artificielle de la protéine CFTR-F508del

Plusieurs procédés ont été utilisés pour tenter de résoudre le problème d'adressage de la protéine CFTR-F508del. Ainsi, l'abaissement de la température à 26°C (Denning *et al.*, 1992a; Sharma *et al.*, 2001) ou l'utilisation de chaperonnes chimiques comme le glycérol, le DMSO (DiMéthylSulfOxide) ou le TMAO (TriMéthylAmine N-Oxide) (Brown *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 2001) ont permis de corriger le défaut d'adressage de CFTR muté et à diriger la protéine vers la membrane plasmique. Principalement utilisé dans les études, le glycérol est connu depuis longtemps pour stabiliser le niveau de conformation des

protéines (Gekko & Timasheff, 1981a, b) et faciliter leur repliement *in vitro* (Sawano *et al.*, 1992). Les cellules exprimant CFTR-F508del traitées au glycérol montrent une forme mature de la protéine, et leur conductance Cl⁻ dépendante de l'AMPc est partiellement restaurée (Brown *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996). Cependant, l'activité est réduite en raison de la probabilité diminuée de l'ouverture du canal (Haws *et al.*, 1996). L'hypothèse la plus probable est que le traitement par le glycérol stabilise le précurseur de la protéine dans une conformation capable de tromper l'ERQC. Plus récemment, Rennolds et collaborateurs ont montré que la restauration de l'adressage de CFTR-F508del vers la membrane plasmique grâce à un abaissement de la température se fait de manière Golgi-indépendante et engendre la présence à la fois de protéines matures et immatures au niveau de la membrane plasmique (Rennolds *et al.*, 2008).

Il est aussi possible de corriger le défaut d'adressage de CFTR-F508del en utilisant le sodium-4-phénylbutyrate (4PBA), un dérivé non toxique du butyrate de sodium, régulateur transcriptionnel connu pour permettre la surexpression de CFTR. Il agit sur son promoteur dépendant de la metallothionéine (Cheng *et al.*, 1995), et induit la maturation, l'adressage à la membrane plasmique et la restauration de la conductance Cl⁻ AMPc-dépendante (Rubenstein *et al.*, 1997). Le 4PBA agit probablement en modifiant l'interaction entre CFTR-F508del et les protéines chaperonnes HSC70 et HSP70 (Choo-Kang & Zeitlin, 2001; Rubenstein & Lyons, 2001).

En plus du glycérol, du DMSO, du TMAO et du 4PBA, bon nombre d'autres molécules pharmacologiques visant à rétablir l'export de CFTR-F508del à la membrane plasmique existent (Egan *et al.*, 2002; Egan *et al.*, 2004; Norez *et al.*, 2006).

Le fait qu'un abaissement de la température ou qu'un traitement par des chaperonnes chimiques puisse restaurer l'adressage à la membrane plasmique de la protéine CFTR-F508del suggère qu'un mauvais repliement du canal est à l'origine de ce défaut d'adressage. Malheureusement, lorsque CFTR-F508del est adressée à la membrane plasmique, elle y est très instable. Elle est en effet rapidement internalisée et dégradée dans le cytoplasme par la voie ubiquitine/protéasome et la voie lysosomale (Lukacs *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2004; Swiatecka-Urban *et al.*, 2005).

4) Localisation de la protéine CFTR-F508del

Les toutes premières expériences d'immunofluorescence réalisées sur la localisation de la protéine CFTR-F508del ont montré qu'elle se trouve dans un compartiment

péri-nucléaire, et non à la membrane plasmique comme la protéine CFTR sauvage (Cheng *et al.*, 1990). En utilisant des cellules COS transitoirement transfectées soit par CFTR-F508del, soit par CFTR sauvage, il a été observé que CFTR-F508del n'atteint pas la membrane plasmique, suggérant qu'elle ne transite pas par l'appareil de Golgi. Une étude de 1993 montre par microscopie électronique que le compartiment où est bloquée CFTR-F508del est le RE (Fig. I14) (Yang *et al.*, 1993). Cette observation a été confirmée par d'autres équipes (Lukacs *et al.*, 1994; Ward & Kopito, 1994). La protéine CFTR-F508del est bloquée dans une mauvaise conformation sous sa forme immature au niveau du RE, puis dégradée rapidement (Ward & Kopito, 1994).

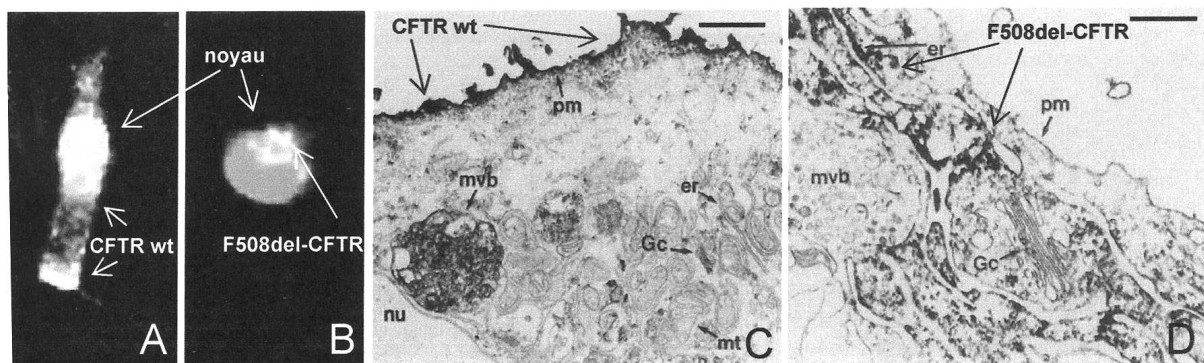


Figure I14 : Localisation des protéines CFTR sauvage (A et C) et CFTR-F508del (B et D).

A-B: images en microscopie confocale de cellules brosseées 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 : 1µm (C) et 0,5µm (D).

Modifié d'après Yang *et al.*, 1993 et Dormer *et al.*, 2001.

Une autre étude a montré que la protéine CFTR-F508del peut interagir avec la protéine ERGIC53, qui est marqueur du compartiment ERGIC se situant entre le RE et le *cis*-Golgi (Gilbert *et al.*, 1998), suggérant ainsi qu'une infime partie des protéines CFTR-F508del échapperait à l'ERQC. Confirmant cette observation, des études ont montré que CFTR-F508del est localisée au niveau de la membrane plasmique des épithélia respiratoires et intestinaux de patients homozygotes pour la mutation, suggérant un défaut de localisation tissu spécifique (Kälin *et al.*, 1999), et que c'est aussi le cas dans des épithélia de souris homozygotes pour CFTR-F508del (Steagall & Drumm, 1999).

5) Dégradation de la protéine CFTR-F508del

Les systèmes « Unfolded Protein Response » (UPR) et ERAD représentent deux voies d'élimination des protéines ayant une conformation incorrecte. Ces deux systèmes se recouvrent partiellement et sont capable de se compenser. En absence d'une réponse UPR fonctionnelle, la capacité du système ERAD est normalement suffisante pour reconnaître les protéines mal repliées, et les conduire vers la dégradation. Ces observations suggèrent que l'ERQC, l'ERAD et l'UPR sont trois systèmes très liés entre eux (Chevet *et al.*, 2001).

a) La réponse UPR et la protéine CFTR-F508del

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

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 disulfures et la déplétion en calcium au niveau 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.*, 1998b). Wang et collaborateurs 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 défectueuse pour son activité kinase, inhibait la réponse UPR. De plus la surexpression de la protéine mIRE1p transfectée induit l'apoptose (Wang *et al.*, 1998b).

La deuxième protéine identifiée, ATF6, subit une protéolyse sous les conditions de stress du RE générant un fragment cytosolique qui est retransloqué dans le noyau et agit comme un facteur de transcription (Haze *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000c).

La 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), provoquant la diminution de la synthèse protéique (Harding *et al.*, 1999).

Plusieurs 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 travaux montrent que BiP interagit 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 relâche Ire1 et PERK, entraînant leur oligomérisation puis leur activation (Bertolotti *et al.*, 2000; Liu & Kaufman, 2003). La dissociation de BiP et d'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.*, 2006a). 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 de 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 tout à fait envisageable. Cependant, l'absence d'interaction directe ou indirecte entre BiP et CFTR (Yang *et al.*, 1993; Pind *et al.*, 1994; Loo *et al.*, 1998), 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 différence 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 et de l'épissage de la protéine XBP-1, le substrat de IRE1 (Nanua *et al.*, 2006).

Cependant, le stress du RE est souvent induit par des protéines mutantes mal repliées (Rutkowski & Kaufman, 2004; Schröder & Kaufman, 2005). Il a ainsi été suggéré que l'accumulation de la protéine CFTR mutée F508del dans le RE peut causer un stress en activant la réponse UPR (Rab *et al.*, 2007). Et une étude plus récente révèle que l'UPR peut

être déclenchée dans la MV (Kerbiriou *et al.*, 2007). Ceci supporte aussi des observations antérieures selon lesquelles l'activation de l'UPR inhibe l'expression endogène de CFTR (Rab *et al.*, 2007). En effet, les auteurs montrent que l'activation de l'UPR affecte le niveau d'expression de CFTR endogène au niveau de l'ARNm, mais pas celui de CFTR exogène, suggérant que cette répression transcriptionnelle est ciblée au niveau du promoteur de CFTR endogène.

b) Les chaperonnes de l'ERQC et la protéine CFTR-F508del

La reconnaissance des protéines CFTR-F508del comme étant des protéines de conformation incorrecte et leur adressage vers la voie de dégradation se fait par le système ERQC. 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 de l'ERQC. L'utilisation de drogues perturbant l'interaction avec la chaperonne HSP90, comme la geldanamycine déstabilise la protéine CFTR-F508del et conduit à son élimination (Loo *et al.*, 1998).

Plus récemment, de nouvelles co-chaperonnes de Hsp90, p23 et Aha1, ont été identifiées, plaçant Hsp90 comme un point central de décision pour le devenir de CFTR (Wang *et al.*, 2006). La co-chaperonne p23 inhibe l'activité ATPasique de Hsp90, mais stimule la formation du complexe de repliement comprenant Hsp90 et stabilise la liaison entre Hsp90 et la protéine en cours de repliement (Wegele *et al.*, 2004). Les études de Wang 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 (Wang *et al.*, 2006). 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. A l'inverse, la cochaperonne Aha1 est un stimulateur de l'activité ATPasique de Hsp90 qui agit comme un cofacteur tardif dans le complexe Hsp90-CFTR-F508del (Wegele *et al.*, 2004). Wang et collaborateurs 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 (Wang *et al.*, 2006).

La chaperonne Hsp70 semble, quant à elle, impliquée dans le contrôle qualité de CFTR-F508del et sa rapide dégradation. L'équipe de Yang a montré en 1993 que la forme immature des protéines CFTR sauvage et mutée interagit 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 niveau du 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 cohérent avec l'existence de deux formes de CFTR sauvage dans le RE : formes B et B' (Zhang *et al.*, 1998). Cette incapacité à se replier, et donc à passer l'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 (Rubenstein & Zeitlin, 2000; Choo-Kang & Zeitlin, 2001), alors que sa surexpression n'a pas l'air d'avoir d'effet notable sur la stabilité de CFTR sauvage ou de CFTR-F508del (Farinha *et al.*, 2002). De manière intéressante, la surexpression de la cochaperonne 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). Il a aussi été 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 (Younger *et al.*, 2006).

En effet, la délétion de la phénylalanine en position 508 provoque l'arrêt de la maturation de CFTR dans une conformation incorrecte, reconnue par RMA1. Il semblerait que l'E3 RMA1 détecte les défauts de repliement de manière co-traductionnelle alors que l'E3 CHIP les détecte de manière post-traductionnelle. De ce fait RMA1 et CHIP agiraient 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 (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 que l'on ne retrouve pas dans une cellule où la protéine mutée est exprimée de façon endogène. Une étude a démontré que la protéine CFTR-F508del interagit 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 décrit par Farinha et collaborateurs 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 et que ce dernier niveau de contrôle prendrait en charge la protéine CFTR-F508del (Farinha & 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 qu'une surexpression de la CNX augmente la quantité de CFTR-F508del au niveau du RE (Okiyoneda *et al.*, 2004).

c) Voies impliquées dans la dégradation de la protéine CFTR-F508del

Différentes études ont démontré que la voie ubiquitine-protéasome est responsable, au moins en partie, de la dégradation co- et post-traductionnelle de la protéine CFTR ubiquitinylée de conformation incorrecte. En particulier, 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 ainsi montré que la protéine CFTR, suite à ces traitements, se retrouve 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 par le système ERAD grâce aux 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 (Bebök *et al.*, 1998) et du protéasome cytosolique, pouvant être ou non associé au RE, ou des deux (Oberdorf *et al.*, 2001).

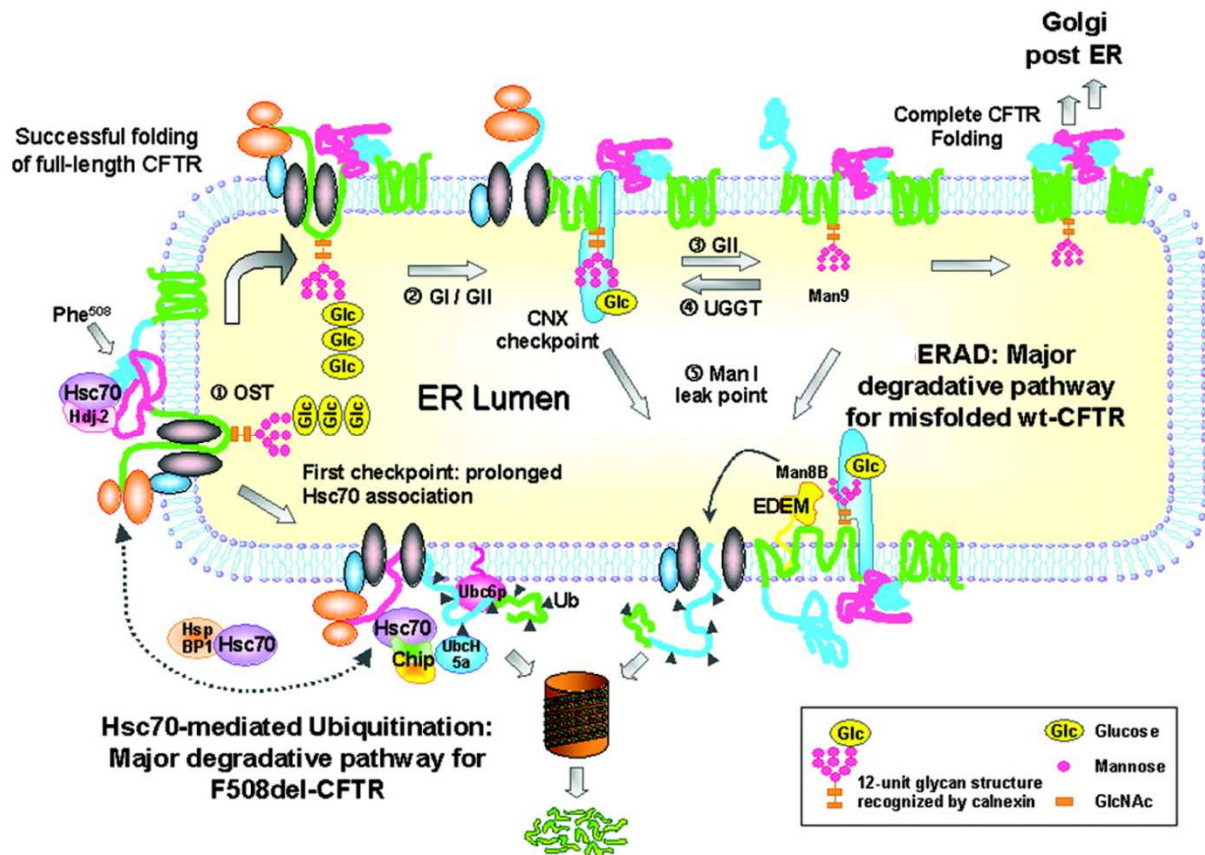


Figure I15 : Modèle des voies de dégradation majeures de CFTR sauvage et mutée F508del.

(i) La synthèse de la protéine CFTR débute avec son insertion dans la membrane du réticulum endoplasmique et l'attachement d'un complexe Hsc70/Hdj-2 (ou Hsp70/Hdj-1) au domaine cytosolique naissant. La cellule utilise ce contrôle Hsc70/Hsp70 comme premier point de contrôle pour évaluer la conformation de CFTR. La rétention prolongée de CFTR-F508del mal replié par Hsc70 permet à CHIP d'interagir avec Hsc70/Hsp70 (probablement en déplaçant Hdj-2) et entraîne la dégradation du mutant par la voie Hsc70-CHIP-UbcH5a. Le E2 Ubc6 peut également contribuer à la dégradation de CFTR-F508del au niveau du réticulum endoplasmique. Contrairement à ce qui se passe avec CFTR-F508del, CFTR sauvage, pour lequel l'interaction intramolécule NBD1-R et le repliement est correctement réalisé, continue dans la voie de repliement à travers l'interaction de ses résidus N-glycosyl (ii) avec la calnexine (iii). CFTR sauvage acquiert sa conformation native par des séries successives de libération-déglucosylation (iv) et reliaison-reglucosylation (v) par la calnexine, qui constitue également le second point de contrôle de l'ERQC. Après un repliement correct, CFTR sort du réticulum endoplasmique et se dirige vers la voie de sécrétion (vi). Toutefois, la présence prolongée dans le cycle de la calnexine peut amener CFTR mal pliée à être un substrat de la mannosidase I (vii). Cette enzyme clive les résidus mannoses, et peut générer le glycane intermédiaire Man8B qui est reconnu par l'EDEM, qui cible la protéine à l'ERAD (viii). Selon ce modèle, CFTR-F508del suit une voie majeure de dégradation du premier point de contrôle de l'ERQC(Hsc70-dépendant), alors que la protéine CFTR sauvage mal repliée subit une dégradation protéolytique au second point de contrôle (calnexine-dépendant).

D'après Farinha & Amaral, 2005.

Cependant, ces auteurs montrent que malgré l'inhibition du protéasome, la dégradation des protéines CFTR sauvages ou mutées, bien que ralentie, continue. Ce ralentissement 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; De Keukeleire *et al.*, 2008). Tous ces éléments laissent penser qu'il existe d'autres systèmes protéolytiques 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'autre système de dégradation et que l'inhibition incomplète de la dégradation de CFTR provient d'une inhibition partielle du protéasome. Ils ont alors 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). *A contrario*, une étude menée par l'équipe de Dorner tend à montrer que des cystéines-protéases pourraient être impliquées dans la voie de dégradation de la protéine CFTR (Stratford *et al.*, 2003).

Il est à 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 & Ozols, 1998; Loo & Clarke, 1998; Amshoff *et al.*, 1999; Cabral *et al.*, 2000; Mancini *et al.*, 2003). L'équipe de Sifers a par exemple montré que la protéine α 1-antitrypsine humaine incorrectement repliée 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). Plus 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).

Récemment, il a été montré dans notre laboratoire que l'élimination de CFTR-F508del est plus dépendante du GTP que de l'ATP (De Keukeleire *et al.*, 2008). La caractérisation biochimique suggère la participation de protéines G hétérotrimériques et la spectrométrie de masse a permis d'identifier, dans la fraction microsomale enrichie en RE, deux protéines GTPasiques appartenant à la famille des protéines $G\alpha$: $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.

II) Les GTPases, ou protéines G

Par définition, les GTPases lient et hydrolysent le GTP, une coenzyme de transfert de groupement phosphate, et existent ainsi sous trois formes : liées au GTP, liées au GDP et vides (échange entre le GDP et le 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 protéines G monomériques (ou petites protéines G) comme Ras, Rho, Rac, Sar, SRP..., et les protéines G hétérotrimériques (ou grosses protéines G) composées de trois sous-unités (α , β et γ).

Les protéines G sont caractérisées par des séquences consensus de liaison et d'hydrolyse du GTP (Fig. I19).

A) Les petites protéines G

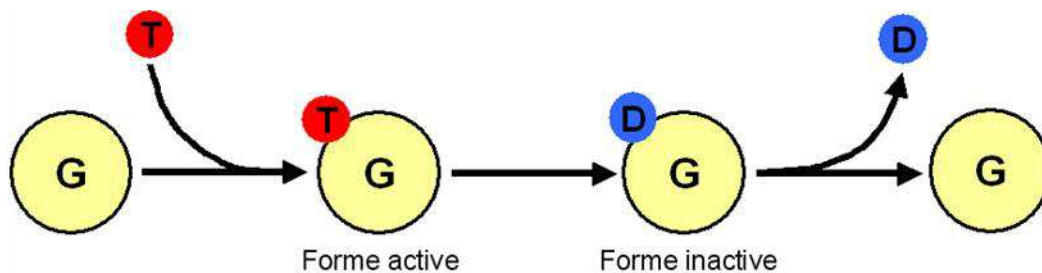


Figure I16 : Cycle des protéines G monomériques.

L'activation de la protéine G se fait par la liaison du GTP, qui est ensuite hydrolysé par l'activité GTPasique de la protéine G, ce qui permet le retour à la forme inactive. T : GTP ; D : GDP.

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 $G\alpha$ des grosses protéines G) responsable de l'échange GTP-GDP et de l'activité GTPasique intrinsèque. L'échange du GDP pour du 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 Gln61, placés dans le domaine Ras-like joue un rôle primordial dans la stabilisation de l'état de transition (Li, 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 grosses protéines G

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 (Fig. I17).

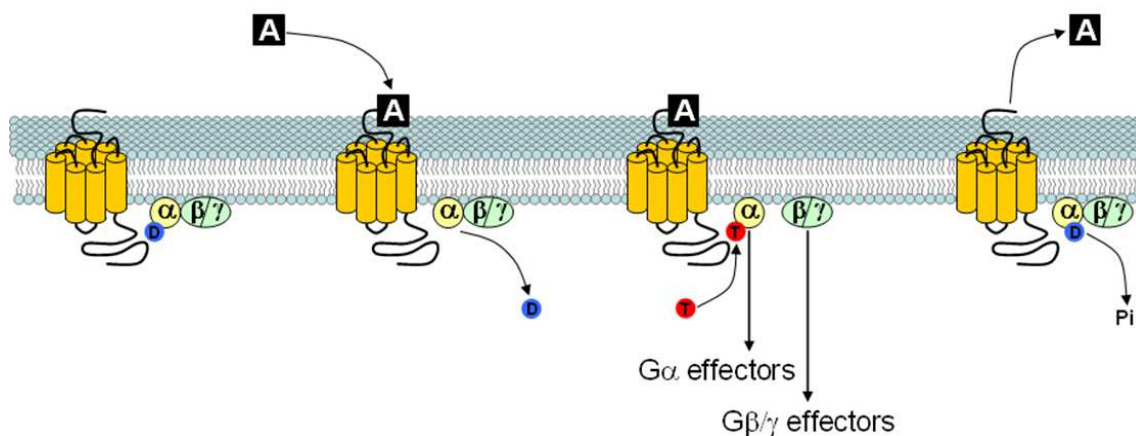


Figure I17 : Transduction du signal par les grosses protéines G.

La protéine constituée de cylindres jaunes représente un récepteur couplé aux protéines G hétérotrimériques ; A : activateur du récepteur ; α : sous-unité α de la protéine G ; $\beta\gamma$: sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G ; D : GDP ; T : GTP.

À l'état inactif, les 3 sous-unités α et $\beta\gamma$ sont associées, la sous-unité α étant liée à une molécule de GDP. La vision communément admise postule que la fixation du ligand, ou premier messager, tel les hormones ou les ions Ca_2^+ sur le RCPG va entraîner un changement conformationnel du récepteur qui va impliquer une affinité supérieure pour une protéine G hétérotrimérique particulière et favoriser leur association. Cette interaction engendre une modification de la conformation de la sous-unité α induisant une diminution de l'affinité de la sous-unité α pour le GDP, favorisant alors la fixation d'une molécule de GTP à la place du GDP. Cet échange va permettre l'activation des protéines G et entraîner la dissociation du complexe hétérotrimérique en une sous-unité α et un dimère $\beta\gamma$ (Neer, 1995). La sous-unité α liée au GTP, mais également le dimère $\beta\gamma$, vont pouvoir interagir avec les effecteurs appropriés. Puis le GTP est hydrolysé en GDP grâce à l'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité α , permettant la reformation du complexe $\alpha\beta\gamma$ inactif (Wang *et al.*, 2002; Milligan

& Kostenis, 2006). Toutefois, ce modèle classique à trois partenaires (RCPG, protéines G et effecteurs) laisse maintenant place à un modèle à quatre partenaires. En effet, l'hydrolyse spontanée du GTP, au sein des $G\alpha$ -GTP purifiées, est trop lente pour rendre compte des vitesses de désactivation de leurs effecteurs. Un quatrième partenaire au système a ainsi été identifié : il s'agit des protéines RGS (Regulator of G-protein Signaling). Ces protéines accélèrent de 50 à 100 fois l'hydrolyse du GTP des sous-unités $G\alpha$ et comprennent plus de 30 membres (Dohlman & Thorner, 1997).

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 des complexes ternaires formés de fluor, d'aluminium et d'ion hydroxyle notés AlF_x . Ces molécules inorganiques miment la structure chimique du phosphate γ et affectent l'activité de nombreuses enzymes GTPases et ATPases (Li, 2003). La transducine (Gt) est une des premières protéines G ayant 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 l' 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 : Gln204 et Arg178 et le phosphate γ du GTP. Dans ce modèle, l' 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 $G\alpha$ (Li, 2003).

Mittal et collaborateurs ont été les premiers à détecter qu'en présence de quantité stœchiométrique de Ras-GDP et de GAP (GTPase-Activating Proteins), 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 (Li, 2003).

En effet, des études ont confirmées que l' 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 (Bourne *et al.*, 1991; Ahmadian *et al.*, 1997).

1) Les sous-unités G $\beta\gamma$

G $\beta\gamma$ représente un complexe de deux sous-unités de la protéine G associées sous forme de dimère très stable qui est uniquement dissocié dans des conditions de dénaturation (Hamm & Gilchrist, 1996). L'association entre G $\beta\gamma$ est non-covalente et a lieu au niveau du cytosol, avant l'acheminement du complexe à la membrane plasmique (Hamm & Gilchrist, 1996). La sous-unité G γ , une petite protéine de 9 kDa, est composée de deux hélices alpha, dont l'une est impliquée dans l'interaction avec G β (Clapham & Neer, 1997). Il existe 13 isoformes de G γ qui ont une identité de séquence comprise entre 27-75% (Hamm & Gilchrist, 1996).

Chez l'Homme, il existe cinq formes distinctes de sous-unités G β , G β 1 à 5, qui présentent une grande similarité de séquence comprise entre 50-83% (Hamm & Gilchrist, 1996). La sous-unité G β , une protéine d'environ 35 kDa, est constituée de deux régions structurales distinctes, un segment N-terminal d'environ 20 acides aminés en hélice alpha impliqué dans l'interaction avec la sous-unité G γ , le reste de la séquence est impliqué dans la formation d'une structure particulière répétée 7 fois (Clapham & Neer, 1997). Cette séquence répétée est appelée 'WD-repeat' et n'est pas unique à la sous-unité G β . En effet, plus d'une quarantaine de protéines possèdent un motif 'WD-repeat'. Ces protéines sont impliquées dans plusieurs phénomènes cellulaires tels que la transduction des signaux, l'épissage des pré-ARNm, la régulation transcriptionnelle, l'assemblage du cytosquelette et le transport des vésicules (Tam & Saier, 1993). Le lien qui uni les membres de cette superfamille est leur capacité à former des assemblages macromoléculaires. Par conséquent, cette propension à former des complexes protéiques s'avère être une part essentielle du fonctionnement de ces protéines à WD-repeat. La structure cristalline révèle que la sous-unité G β est principalement composée de feuillets- β arrangés en anneau, ressemblant à une hélice de bateau. Chacun des 'WD-repeat' est formé de deux dimères de résidus Tryptophane-Aspartate (WD) et de Glycine-Histidine (GH) séparés par une région variable de 40 acides aminés (Tam & Saier, 1993). L'implication de G $\beta\gamma$ dans la signalisation se fait à plusieurs niveaux en participant à l'activation des récepteurs, en influençant le cycle GTPasique de la sous-unité G α ainsi qu'en permettant l'activation de certains effecteurs tels que certains canaux ioniques, la phosphatidyl-inositol 3'-kinase (PI3K), les PLC- β , les Src ainsi que l'activation des adénylates cyclases ACII, IV et l'inhibition des adénylates cyclases de type I (Schwindinger & Robishaw, 2001). De plus, le dimère participe directement à la désensibilisation des récepteurs en permettant le recrutement des kinases de la famille de GRK2 (Boekhoff *et al.*, 1994).

2) Les sous-unités G α

Les protéines G α sont réparties en plusieurs classes, en fonction des homologies de séquence et de leur capacité à activer ou à inhiber certains effecteurs (Fig. I18 et Tab. II).

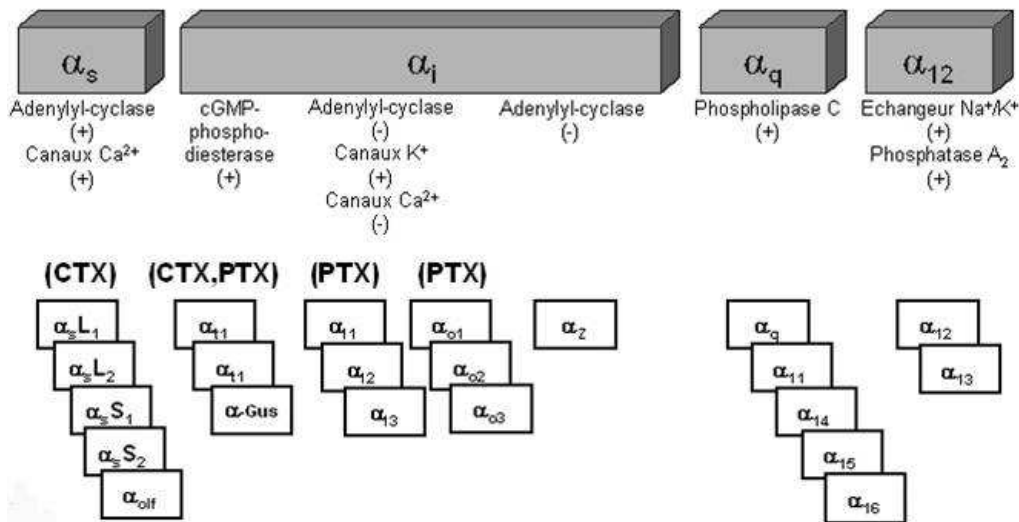


Figure I18 : Les classes de protéines G hétérotrimériques.

Les cadres gris représentent les différentes familles de sous-unité α . Les + représentent une activation, les - une inhibition. Entre parenthèses sont les toxines inhibant les sous-unités α . Dans les cadres blancs se trouvent les différents membres de chaque famille de sous-unité α .

- G s (stimulatrice) active l'adénylate cyclase afin d'augmenter la synthèse d'AMPc.
Golf (olfactive) est associé aux récepteurs olfactifs.
- G i (inhibitrice) inhibe l'adénylate cyclase.
Gt (transducine) transduit les signaux visuels dans la rétine en conjonction avec la rhodopsine.
- G q stimule la phospholipase C.
- G 12 , importante pour réguler le cytosquelette, les jonctions cellulaires, et les autres processus liés au mouvement.

Les sous-unités G α possèdent un domaine en hélice α et un domaine GTPasique similaire à la structure de p21ras (Gilman, 1987). Plus précisément, le domaine GTPasique est composé de cinq hélices α entourant six feuillets β standards, dont cinq parallèles et un antiparallèle. Le domaine en hélice α possède une longue hélice α entourée par cinq hélices plus courtes et est lié au domaine GTPasique par deux segments, le premier composé des résidus 54 à 58 et le deuxième des résidus 173 à 179 (Raw *et al.*, 1997). Ces deux segments lient une structure en fourche responsable de la liaison des nucléotides (GDP/GTP). Les

changements conformationnels de cette structure en fourche favorisent le contact avec le dimère $\beta\gamma$. En dehors de certaines régions communes, les protéines $G\alpha$ sont très divergentes et il est possible de les classer en quatre sous-types : G_s , G_i , G_q et G_{12} (Tab I1).

Tableau I1: Classification des sous-unités α des protéines G.

Familles	Sous-types	Effecteurs	Expression	Modulateurs Pharmacologiques
G_s	$G\alpha_s(S)$ $G\alpha_s(L)$ $G\alpha_s(XL)$ $G\alpha_{olf}$	Adénylate cyclase Canaux Maxi K Src tyrosine kinase Tubuline	$G\alpha_s$: ubiquitaire $G\alpha_{olf}$: neurones	CTX
G_i	$G\alpha_{o1}$ $G\alpha_{o2}$ $G\alpha_{i1}$ $G\alpha_{i2}$ $G\alpha_{i3}$ $G\alpha_z$ $G\alpha_{t1}$ $G\alpha_{t2}$ $G\alpha_{gust}$	Adénylate cyclase Rap1GAPII ERK/MAPkinase Canaux K^+ Canaux Ca_2^+ Src tyrosine kinase Tubuline cGMP-PDE	$G\alpha_o$: neurone $G\alpha_{i1-13}$: ubiquitaire $G\alpha_z$: neurones et plaquettes $G\alpha_{t1}$: cellules bâtonnets $G\alpha_{t2}$: cellules cônes $G\alpha_{gust}$: cellules du goût aigre/doux	$G\alpha_o$: PTX $G\alpha_i$: PTX $G\alpha_t$: PTX, CTX $G\alpha_{gust}$: PTX
G_q	$G\alpha_q$ $G\alpha_{11}$ $G\alpha_{14}$ $G\alpha_{15/16}$	Phospholipase C β p63-RhoGEF Bruton's tyrosine kinase Canaux K^+	$G\alpha_{q/11}$: ubiquitaire $G\alpha_{15/16}$: cellules hématopoïétiques	$G\alpha_{q/11}$: YM-254890
G_{12}	$G\alpha_{12}$ $G\alpha_{13}$	E-cadhérine ZO-1 p115RhoGEF PDZ-RhoGEF LARG Protein Phosphatase 5 (PP5) AKAP110	ubiquitaire	

a) La classe G_s

La classe G_s est composée des $G\alpha_s$ et $G\alpha_{olf}$, identiques à près de 88% (Neves *et al.*, 2002). La sous-unité $G\alpha_s$ est exprimée dans la majorité des cellules, par contre l'expression de $G\alpha_{olf}$ est limitée à certains neurones. Toutes deux possèdent la capacité d'activer l'adénylate cyclase. L'activation de cette enzyme permet la conversion de l'ATP en AMPc, qui est un second messenger important dans l'activation de la PKA ainsi que dans l'activation de la protéine EPAC (Exchange Protein directly Activated by cAMP). $G\alpha_s$ et $G\alpha_{olf}$ sont également

des substrats pour une ADP-ribosylation catalysée par une toxine de *Vibrio cholerae*, la toxine cholérique (CTX). Cette modification post-traductionnelle inhibe l'activité GTPasique de la protéine G, résultant en une protéine bloquée dans sa conformation active (Neves *et al.*, 2002). En plus d'induire la production d'AMPc, $G\alpha_s$ interagit avec les kinases c-Src et Hck, protéines régulatrices importantes dans plusieurs voies de signalisation, dont la transactivation des récepteurs tyrosine kinase par les RCPG (Ma *et al.*, 2000). La fixation de $G\alpha_s$ (sous forme active liée au GTP) à c-Src entraîne un changement structural au sein de cette kinase, favorisant ainsi son autophosphorylation et son activation. De plus, cette stimulation de c-Src est indépendante de l'action de $G\alpha_s$ sur l'adénylate cyclase (Ma *et al.*, 2000). En plus d'interagir avec c-Src, $G\alpha_s$ peut également se fixer aux tubulines et promouvoir leurs activités GTPasiques (Sarma *et al.*, 2003). La tubuline est une GTPase importante pour l'assemblage dynamique des microtubules, l'une des composantes du cytosquelette des cellules (Roychowdhury & Rasenick, 2008). Sous l'action des RCPG, les $G\alpha_s$ sont les seules sous-unités $G\alpha$ capables d'internaliser et de permettre l'activation des tubulines dans le cytosol (Dave *et al.*, 2009).

b) La classe Gi

La classe Gi est composée de $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$, des deux isoformes rétiennes $G\alpha_{i1}$ et $G\alpha_{i2}$, des isoformes du système nerveux central $G\alpha_{o-A}$ et $G\alpha_{o-B}$, ainsi que $G\alpha_z$ principalement exprimée dans les plaquettes sanguines (Ho & Wong, 1998). Tous les membres de cette famille contiennent un résidu cystéine en C-terminal (sauf $G\alpha_z$) sensible à l'ADP-ribosylation par la toxine de *Bordetella pertussis*, la toxine pertussique (PTX) (Hsia *et al.*, 1984). Cette modification covalente irréversible rend impossible la libération du GDP suite à la fixation d'un ligand sur un récepteur couplé à Gi. Le blocage des réponses cellulaires par la PTX a été un outil important pour l'étude de l'implication des protéines Gi dans les processus de signalisation cellulaire. Ainsi, il a été déterminé que la sous-unité $G\alpha_t$ active la GMPc phosphodiesterase de la rétine, un effecteur majeur dans la vision chez les vertébrés (Roof *et al.*, 1985). Les membres de la sous-famille $G\alpha_i$ et $G\alpha_o$ sont impliqués dans l'inhibition de l'adénylate cyclase, dans la régulation de certains canaux ioniques et dans la régulation de la phospholipase C. Tout comme $G\alpha_s$, $G\alpha_{i1}$ (contrairement à $G\alpha_{i2}$) est capable d'interagir avec la tubuline (Dave *et al.*, 2009). Pour ce qui est de la sous-unité $G\alpha_z$, comparativement aux autres membres de la famille $G\alpha_i$, son expression est limitée à certains neurones et aux plaquettes et cette $G\alpha$ n'est pas inhibée par la PTX. Par contre, $G\alpha_z$ semble avoir des actions identiques aux

autres $G\alpha_i$ sur les différents effecteurs et être activée par les mêmes RCPG (Fields & Casey, 1997).

c) La classe Gq

La classe Gq contient cinq membres : $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$ et $G\alpha_q$. Les membres de cette classe ne sont pas des substrats pour la réaction d'ADP-ribosylation catalysée par la PTX et la CTX. $G\alpha_q$ est responsable de la régulation de la classe β des phospholipases de type C (PLC- β), qui est impliquée dans l'accumulation du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3) qui entraînent la libération des réserves de Ca^{2+} . $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ sont largement exprimés dans tous les tissus, contrairement aux autres membres de cette famille dont l'expression est plutôt restreinte à certains types cellulaires (Neves *et al.*, 2002). De plus, $G\alpha_q$ semble être impliquée dans la régulation de certaines GTPases de type Rho, en activant par exemple p63RhoGEF (Lutz *et al.*, 2005).

d) La classe G12

Finalement, la dernière classe de sous-unités $G\alpha$ est composée de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$. Malgré le fait qu'elles soient exprimées dans la majorité des tissus, les fonctions de ces deux $G\alpha$ ne sont pas clairement définies. L'expression et l'activation de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans des cellules embryonnaires P19 en différenciation ont été observées en réponse à l'acide rétinoïque (Neves *et al.*, 2002). Une des fonctions les plus connues pour cette famille de protéines G est leur implication dans l'activation de RhoA via l'interaction avec des protéines à activité échangeuse de nucléotide (GEF = Guanine nucleotide Exchange Factor). La première GEF rapportée comme interagissant avec $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ est p115RhoGEF (Kozasa *et al.*, 1998). En plus d'activer RhoA, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont impliqués dans la réorganisation du cytosquelette en permettant l'activation des cadhérines (Meigs *et al.*, 2001; Meigs *et al.*, 2002). $G\alpha_{12}$ est impliquée dans la translocation de la protéine phosphatase 5 (PP5) et est responsable également de l'activation de cette phosphatase par l'acide arachidonique (Yamaguchi *et al.*, 2002). La stimulation des récepteurs couplés à $G\alpha_{13}$ engage l'activation sélective de la protéine PKA sans l'élévation de la concentration d'AMPc. $G\alpha_{13}$ en se fixant à l'AKAP110 permet le relâchement de la sous-unité catalytique de PKA du complexe AKAP110-PKA (Niu *et al.*, 2001). En plus de ces exemples, des données indiquent que $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ peuvent interagir avec de nouvelles protéines et influencer leurs fonctions, comme par exemple le transporteur Na^+/H^+ (Lin *et al.*, 1996).

Les sous-unités $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, seuls membres de la famille G12, n'ont été que peu étudiées, mais semblent d'ores et déjà impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Elles possèdent les séquences consensus des protéines G (Fig. I19).

$G\alpha_{12}$	25	AGSGARDAEREARRSRDIDALLAREERRAVRRLVKILLLGAGEGGKSTFLKQMRIHGRE	84
$G\alpha_{13}$	16	PGCLLTSGEAEQQRKSKEIDKCLSREKTYVKRLVKILLLGAGESGKSTFLKQMRIHGD	75
$G\alpha_{12}$	85	FDQKALLEFRDTIFDNILKGSRLVDARDKLGIPWQYSENEKHGMFIMAFENKAGLP---	141
$G\alpha_{13}$	76	FDQRAREEFRPTIYSNVIKGMRLVDAREKLHLPWGDNSNQGHGDKMMSFDTRAPMAAQG	135
$G\alpha_{12}$	142	-VEPATFQLYVPALSALWRDSGIREAFSRRSEFQLGESVKYFLDNLDRIQILNYFPSKQD	200
$G\alpha_{13}$	136	MVETRVFLQYLPALRALWADSGIQNAYDRRREFQLGESVKYFLDNLDKLGEPDYTPSQD	195
$G\alpha_{12}$	201	ILLARKATKGIVEHDFVIKKIPFKMVDVGGQRSQRQKWFQCFDGITSILFMVSSSEYDQV	260
$G\alpha_{13}$	196	ILLARPTKGIHEYDFEIKNVPFKMVDVGGQRSERKRWFECFDSVTSILFLVSSSEFDQV	255
$G\alpha_{12}$	261	LMEDRRTNRLVESMNIFETIVNNKLFVNSIILFLNKMDDLVEKVKTVSIKKHFPDFRGD	320
$G\alpha_{13}$	256	LMEDRLTNRLTESLNIFETIVNNRVFSNVSIILFLNKTDLLEEKVQIVSIKDYFLEFEGD	315
$G\alpha_{12}$	321	PHRLEDVQRYLVQC FDRKRRN-RSKPLFHHFTTAIDTENVRFVHAVKDTILQENLKDIM	379
$G\alpha_{13}$	316	PHCLRDVQKFLVECFRNKRRDQQQKPLYHHFTTAINTENIRLVFRDVKDTILHDNLKQIM	375
$G\alpha_{12}$	380	LQ	381
$G\alpha_{13}$	376	LQ	377

Figure I19 : Alignement des séquences de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ et motifs consensus.

Le motif 1 est le motif Walker A de liaison à l'ATP et au GTP, le motif 2 est une séquence consensus d'hydrolyse du GTP et le motif 3 est une séquence consensus de liaison du GTP.

i) Localisation

$G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont exprimés dans tous les tissus de l'organisme (Milligan *et al.*, 1992; Spicher *et al.*, 1994). Cependant leur localisation à l'échelle cellulaire est peu connue. Au niveau des cellules épithéliales, ces protéines sont partiellement localisées au niveau des jonctions cellulaires (Denker *et al.*, 1996; Dodane & Kachar, 1996; Hamilton & Nathanson, 1997). Comme toutes les autres protéines G hétérotrimériques, elles sont aussi localisées au niveau de la membrane plasmique (Spicher *et al.*, 1994). Plus récemment, il a été montré que la partie N-terminale de $G\alpha_{12}$, mais pas $G\alpha_{13}$, présente une séquence de localisation dans la mitochondrie (Andreeva *et al.*, 2008).

ii) Activation

Plus de 30 récepteurs couplés aux protéines G ont été rapportés comme interagissant avec $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, ou les deux (Riobo & Manning, 2005). De nombreux RCPG peuvent se lier et activer plus d'un membre d'une sous-famille de protéine G (Yamaguchi *et al.*, 2003). Des études suggèrent que la plupart des récepteurs interagissant avec $G\alpha_{12}$ peuvent interagir avec

$G\alpha_{13}$, et *vice versa* (Riobo & Manning, 2005). De plus, de nombreux récepteurs se liant à $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ peuvent également se lier à d'autres protéines G, et plus particulièrement $G\alpha_q$ (Hermans, 2003; Riobo & Manning, 2005; Zhang *et al.*, 2006c). Ceci rend très difficile l'analyse précise des voies de signalisation de ces protéines G. Il a également été montré que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ peuvent être phosphorylées par la PKC, et que cette phosphorylation peut être induite par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), et inhibée par la calphostine C (Calph C) (Offermanns *et al.*, 1996).

iii) Désactivation

Tout comme les autres sous unités α des protéines G, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ alternent entre un état inactif lorsqu'elles sont liées au GDP et un état actif lorsqu'elles sont liées au GTP et possèdent une activité GTPasique intrinsèque. Certaines protéines, les GTPase activating proteins (GAP), permettent d'accélérer la désactivation des protéines G. Les protéines p115RhoGEF et leukemia-associated RhoGEF (LARG) ont été montrés comme agissant comme des GAP spécifiques pour $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ *in vitro* (Kozasa *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2003). p115RhoGEF, LARG et PDZ-RhoGEF/GTRAP48 sont les membres connus de la famille des RhoGEF de mammifères, qui contiennent un domaine d'homologie des RGS qui reconnaît les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ activées (Fukuhara *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005b; Tesmer *et al.*, 2005; Kreutz *et al.*, 2006). Bien que p115RhoGEF et LARG soient des GAP spécifiques de $G\alpha_{12/13}$, PDZ-RhoGEF ne semble pas avoir d'activité GAP pour ces sous unités (Hart *et al.*, 1998; Kozasa *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2003).

iv) Fonctions

Appuyant le rôle central de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, des études montrent qu'une régulation anormale de leurs voies de signalisation est présente dans certaines pathologies comme la leucémie, la transformation cellulaire, l'invasion tumorale et les métastases, l'hypertension et l'ataxie (Voyno-Yasenetskaya *et al.*, 1994; Aragay *et al.*, 1995; Jho *et al.*, 1997; Kourlas *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2006a; Kelly *et al.*, 2006b; Moers *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2008).

Il semblerait aussi que $G\alpha_{12}$ puisse agir de concert avec d'autres sous unités $G\alpha$ par le biais d'interactions. Le groupe de Sternweis a en effet démontré que l'interaction entre $G\alpha_s$ et $G\alpha_{12}$ permettait une synergie d'action pouvant augmenter la production d'AMPC par l'adénylate cyclase VII (ACVII) (Jiang *et al.*, 2008). La formation d'un complexe ACVII-

$G\alpha_s$ - $G\alpha_{12}$ pourrait expliquer cette synergie d'interaction. Il a aussi été mis en évidence que $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12}$ agissaient de manière synergique pour moduler l'activité de la phospholipase C- β 1 en réponse à l'activation de AT1aR (Ushio-Fukai *et al.*, 1998).

D'autres fonctions plus directes de ces deux protéines ont aussi été rapportées. Ces différentes fonctions sont :

- *Activation des petites protéines G*

Il a été démontré que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ activent les petites protéines G monomériques (Ras, Rho, ARF, Rab et Ran) (Takai *et al.*, 2001).

- *Système immunitaire*

Des souris déficientes en p115RhoGEF présentent des défauts au niveau du système immunitaire, ce qui est appuyé par le fait que p115RhoGEF est fortement exprimé dans les tissus hématopoïétiques (Hart *et al.*, 1996; Whitehead *et al.*, 1996; Aasheim *et al.*, 1997; Girkontaite *et al.*, 2001; Rubtsov *et al.*, 2005). Ces souris ont également une population réduite de cellules T dans leur foie et leurs ganglions lymphatiques, un défaut dans la migration lymphocytaire, la formation de pseudopodes et l'adhésion *via* les intégrines, suggérant que la voie p115RhoGEF, et donc $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, sont requises pour la fonction normale des lymphocytes (Girkontaite *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2006).

- *Croissance et transformation cellulaire*

Des études montrent que, par le biais de RhoA, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ interviennent dans les voies de signalisation concernant la croissance cellulaire et la tumorigenèse (Chan *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1993b; Jones & Gutkind, 1998). Martin et ses collaborateurs ont démontré que la surexpression du récepteur activé par la thrombine (PAR-1) favorise la transformation et la croissance des NIH-3T3 *via* $G\alpha_{12/13}$ (Martin *et al.*, 2001). PAR-1 stimule l'activité du facteur de réponse au sérum et du facteur de transcription NF κ B, qui sont aussi des effecteurs de RhoA. D'autres études suggèrent que les RCPG en amont de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ peuvent favoriser la tumorigenèse et la croissance des cellules tumorales (Aragay *et al.*, 1995; Fukuhara *et al.*, 2001; Radhika & Dhanasekaran, 2001; Marinissen *et al.*, 2003). En effet, des travaux ont démontré que les niveaux protéiques de $G\alpha_{12}$ sont plus élevés dans des tissus de cancers du sein ou d'adénocarcinome prostatique (Kelly *et al.*, 2006a; Kelly *et al.*, 2006b).

- *Système nerveux*

Dans le système nerveux, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ jouent un rôle important dans la migration neuronale, le guidage axonal, la formation des cortex cérébelleux et cérébraux et la libération de neurotransmetteurs (Jho & Malbon, 1997; Katoh *et al.*, 1998; Kranenburg *et al.*, 1999; Dettlaff-Swiercz *et al.*, 2005; Hiley *et al.*, 2006; Moers *et al.*, 2008). Elles activent spécifiquement RhoA dans des lignées cellulaires neuronales et causent une rétraction des neurites (Katoh *et al.*, 1998; Kranenburg *et al.*, 1999). Une étude a démontré que des changements morphologiques pouvaient avoir lieu dans les cellules gliales en réponse à l'activation de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ (Honma *et al.*, 2006). La même étude suggère aussi que la stimulation du récepteur thromboxane A₂ cause une prolifération des astrocytes, principalement *via* la voie de signalisation $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$.

- *Contraction musculaire*

Il est admis que lors de la liaison avec des vasoconstricteurs, les récepteurs se liant à la fois aux membres des familles Gq et G12 stimulent la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) via les voies de signalisation de la kinase Ca^{2+}/MLC afin de réguler le tonus des muscle lisses vasculaires (Gohla *et al.*, 2000). Des souris avec une double déficience conditionnelle pour $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ ont été développées par l'équipe d'Offermanns (Wirth *et al.*, 2008). Les segments aortiques de ces souris présentent des réponses contractiles altérées aux vasoconstricteurs comme l'angiotensine II, le thromboxane A₂ et l'endothéline I. De plus, ces souris sont quasi complètement protégées de l'hypertension induite par le sel, alors que leur pression sanguine basale n'est pas affectée. Des phénotypes similaires ont été observés chez des souris n'exprimant pas LARG dans les cellules des muscles lisses. Ces données suggèrent que la voie $G\alpha_{12/13}$ -LARG est un régulateur clef du tonus musculaire des muscles lisses dans un contexte d'hypertension.

- *Hypertrophie cardiaque*

$G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ activent également la kinase N-terminale c-Jun et stimulent l'échange Na^+/H^+ (Dhanasekaran & Dermott, 1996). Dans les cardiomyocytes, l'activation de cette kinase déclenche les réponses hypertrophiques (Sugden & Clerk, 1998). Il a été décrit que les réponses hypertrophiques induites par le récepteur α_1 -adrénergique sont médiées en partie par une voie $G\alpha_{12/13}$ -Rho-JNK et en partie par une voie $G\alpha_{q/11}$ -JNK indépendante de Rho (Maruyama *et al.*, 2002).

- *Angiogenèse*

Une étude montre qu'une déficience en $G\alpha_{13}$ chez la souris nuit au développement du système vasculaire et est létal au stade embryonnaire (Offermanns *et al.*, 1997). Les mêmes auteurs, ayant cultivé des fibroblastes embryonnaires de ces souris, ont observé une motilité altérée en réponse à la thrombine et au LPA. Bien que la formation de vaisseaux sanguins grâce à la différenciation des cellules progénitrices en cellules endothéliales n'ait pas été affectée, l'angiogenèse, qui comprend la germination, la croissance, la migration et le remodelage des cellules endothéliales existantes, a été gravement perturbé (Offermanns *et al.*, 1997; Offermanns, 2001). Une autre étude utilisant les plaquettes de ces souris dépourvues de $G\alpha_{13}$ montre que cette sous unité est impliqué dans l'hémostase normale et la thrombose. Les plaquettes dépourvues de $G\alpha_{13}$, mais pas celles dépourvues de $G\alpha_{12}$, ont des changements de formes et une agrégation altérés en réponse à plusieurs activateurs plaquettaires *in vitro*, et échouent à former des thrombi stables *ex vivo*. Les souris présentent également une augmentation importante du temps d'arrêt de saignement au niveau de la queue (Moers *et al.*, 2003).

- *Cytosquelette*

$G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ activent des Rho-GEF comme LARG, P115, TRIO et P63, et ont de ce fait une influence certaine sur les processus liés à la plasticité du cytosquelette, tel la chimiotaxie ou la morphogenèse neuronale (Kuner *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2007). En formant des complexes avec ces Rho-GEF, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ favorisent l'activation de RhoA (Sah *et al.*, 2000). Toujours *via* RhoA, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ induisent l'assemblage des filaments d'actine et de myosine (fibres de stress), et sont impliquées dans la contraction cellulaire (Ridley, 2001; Etienne-Manneville & Hall, 2002; Sahai & Marshall, 2002).

- *Jonctions cellulaires*

Meigs et ses collaborateurs ont mis en évidence une interaction entre les protéines de la famille G12 et la partie cytoplasmique des cadhérines de manière indépendante de l'activation de Rho (Meigs *et al.*, 2001; Meigs *et al.*, 2002). Les cadhérines sont des protéines impliquées dans la formation des jonctions cellulaires (Barth *et al.*, 1997; Behrens, 1999). De plus, l'adhésion cellule-cellule médiée par la E-cadhérine est diminuée par $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ et cet effet est spécifique de cette famille de protéines G hétérotrimériques dans un modèle d'expression hétérologue dans les cellules K562 (Meigs *et al.*, 2002). Lin et collaborateurs ont montré, chez le poisson-zèbre, que $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont requises pour la gastrulation (Lin *et al.*,

2005) et régulent l'épibolie en modulant négativement l'activité de l'E-cadhérine (Lin *et al.*, 2009). D'autres études ont montré une interaction entre $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ et la protéine ZO-1 (Zonula Occludens-1), impliquée dans les jonctions serrées (Meyer *et al.*, 2002; Sabath *et al.*, 2008). Ces travaux montrent que $G\alpha_{12}$ régule la perméabilité des cellules épithéliales et inhibe la formation des jonctions serrées dans les cellules rénales MDCK. Meyer et collaborateurs ont démontrés, toujours dans les MDCK, que la protéine $G\alpha_{12}$ hyperactive ($G\alpha_{12}QL$) perturbe les protéines des jonctions serrées et adhérentes, altère la localisation polarisée des protéines membranaires, et réduit la fonction de barrière épithéliale en activant la voie de signalisation de la Src tyrosine kinase (Meyer *et al.*, 2003). Une étude plus récente a démontré que la protéine $G\alpha_{13}$ hyperactive ($G\alpha_{13}QL$) perturbe également les protéines impliquées dans les jonctions serrées et adhérentes des cellules MDCK (Donato *et al.*, 2009).

L'implication, d'une manière directe, des protéines $G\alpha_{12/13}$ dans le développement et le maintien du complexe jonctionnel au niveau des cellules épithéliales rénales suggère que le même mécanisme peut exister dans d'autres épithélia, comme le tissu pulmonaire, le plus gravement atteint dans la MV. Pour mieux apprécier le rôle des protéines $G\alpha_{12/13}$ dans le fonctionnement des complexes jonctionnels, il nous fallait faire connaissance, dans le chapitre ci-dessous, avec ce processus à l'origine de la formation de la barrière luminale.

III) Les complexes jonctionnels

A) Généralités

Chez les organismes pluricellulaires, les cellules sont rattachées entre elles par diverses structures membranaires spécialisées qui assurent ainsi une cohésion de l'ensemble du tissu. Le rôle cohésif de ces structures jonctionnelles a une importance capitale au sein des tissus. Elles forment ainsi une barrière perméable avec l'environnement.

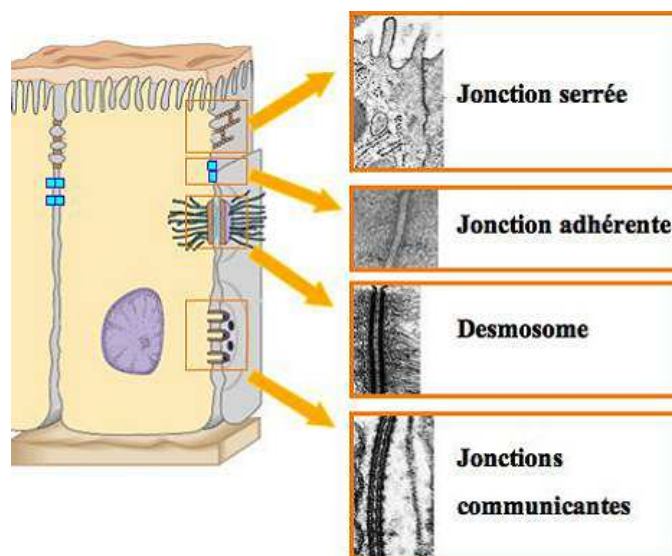


Figure I20 : Organisation des structures d'adhérence intercellulaires.

Les cellules établissent des contacts intercellulaires qui sont organisés en plateforme d'adhérence. La jonction serrée se situe du côté le plus apical des contacts intercellulaires. La jonction adhérente, le desmosome et les jonctions communicantes sont d'autres structures qui permettent le maintien de la cohésion intercellulaire.

Adapté de <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/cells/junctions.jpg>

L'épithélium et l'endothélium sont deux exemples qui illustrent parfaitement cette idée. Ces deux barrières naturelles permettent de compartimentaliser les tissus entre eux, de séparer le sang des tissus sous-jacents, ou de séparer les tissus de l'environnement extérieur.

En plus de leur rôle adhésif, ces plateformes peuvent être modulables et deviennent de véritables structures de signalisation, modifiant profondément la biologie de la cellule. Les structures d'attachement sont matérialisées par diverses molécules d'adhérence transmembranaires. Le plus souvent ce sont les mêmes protéines de deux cellules voisines qui interagissent et permettent ainsi une liaison homophile. Les molécules d'adhérence de l'épithélium ont été les premières étudiées et restent encore les mieux décrites. Elles constituent ainsi un modèle de référence. Les molécules d'adhérence épithéliales s'organisent de manière précise le long de la jonction, ce qui confère à la cellule sa polarité. La première

structure qui se trouve du côté le plus apical est la jonction serrée ou jonction étanche (Fig. I20).

Cette structure est suivie d'une jonction adhérente et de desmosomes répartis le long de la membrane basolatérale jusqu'au pôle basal. De plus, d'autres structures assurent des échanges entre cellules par la création de pores communicants entre cellules adjacentes : ce sont les jonctions communicantes (ou gap junction).

Bien que l'endothélium présente de nombreuses similarités avec l'épithélium, l'organisation des structures jonctionnelles inter-endothéliales présente une hiérarchie différente. Tout d'abord, les cellules endothéliales ne possèdent pas de desmosomes. De plus, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes sont moins organisées et peuvent se superposer suivant le type d'endothélium étudié (Dejana *et al.*, 2009). Dans ce chapitre, seul l'organisation des jonctions épithéliales sera abordée.

B) La jonction serrée (TJ)

1) Présentation

Les jonctions serrées, dénommées aussi jonctions imperméables, sont essentielles dans le maintien de la cohésion cellulaire. Elles empêchent la diffusion de molécules présentes dans la lumière jusqu'aux tissus sous-jacents et restreignent la fuite des lipides et des protéines entre le pôle apical et basolatéral de la membrane plasmique (Harhaj & Antonetti, 2004).

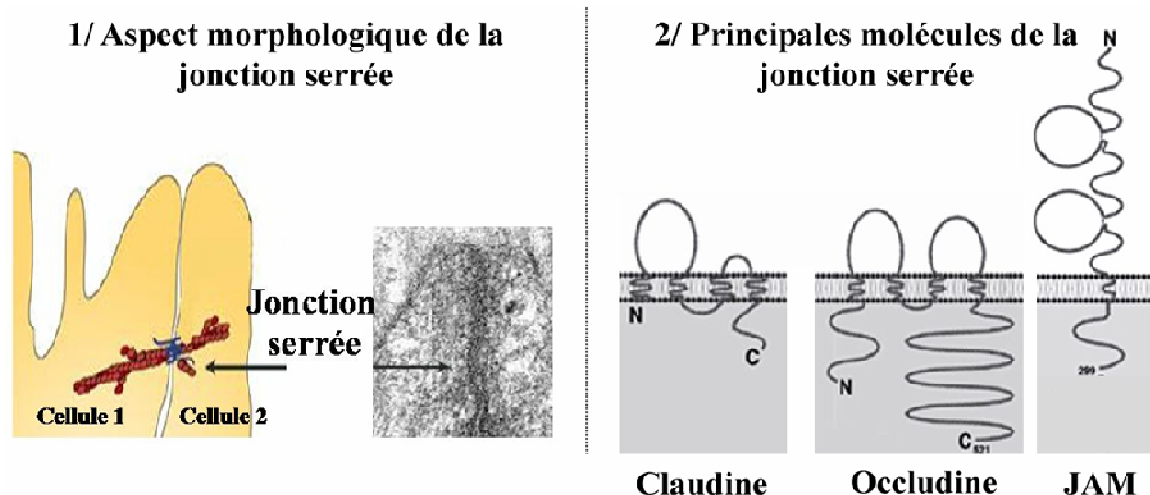


Figure I21 : Organisation et principales molécules des jonctions serrées.

La jonction serrée est une structure adhérente se situant du côté apical de la cellule. Elle est caractérisée par la présence de différentes molécules transmembranaires comme la claudine, l'occludine et la molécule JAM.

Adapté de Kobiak & Fuchs, 2004.

Ces structures, denses aux électrons, se localisent du côté apical de la membrane et peuvent facilement être visualisées en microscopie électronique (Fig. I21). Elles sont composées principalement de trois différentes familles de protéines transmembranaires : les molécules de la famille des claudines (incluant l'occludine) et des molécules d'adhérence de la jonction (JAM, Junctional Adhesion Molecules). Des protéines adaptatrices peuvent interagir avec ces protéines transmembranaires.

2) Principales molécules des jonctions serrées

a) Les claudines

Les molécules de la famille des claudines sont les protéines majeures des jonctions serrées. Elles peuvent former des interactions homophiliques ou hétérophiliques avec d'autres sous types de claudine. Il existe 20 claudines différentes, cependant chaque claudine est spécifique d'un tissu en particulier. Elles présentent toutes la même structure et ont des similarités structurales avec l'occludine. Deux boucles forment la région extracellulaire de la claudine. La partie extracellulaire, et plus précisément sa structure tridimensionnelle, régule le passage des solutés au travers de la monocouche de cellules. La région extracellulaire est suivie d'une région transmembranaire et d'une queue cytoplasmique qui permet la liaison avec des partenaires protéiques comme les protéines ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Zonula Occludens), MUPP1 (Multi-PDZ Protein 1) et PATJ (PALS1-associated TJ protein).

b) L'occludine

L'occludine est historiquement la première protéine mise en évidence au sein des jonctions serrées. Cette protéine possède quatre domaines transmembranaires qui forment deux boucles extracellulaires de taille similaire. La première boucle est impliquée dans l'adhérence intercellulaire alors que la deuxième est responsable de la résistance électrique transépithéliale. Trois domaines cytoplasmiques terminent la molécule. La partie intracellulaire est remarquablement conservée entre les espèces et interagit avec des partenaires cytoplasmiques, comme la protéine ZO-1, ce qui lui permet d'être reliée au cytosquelette d'actine. Elle interagit également avec les protéines ZO-2 et ZO-3 ainsi qu'avec des molécules des jonctions communicantes, la connexine-32 (Kojima *et al.*, 1999) et la connexine-26 (Feldman *et al.*, 2005). L'occludine s'associe à d'autres protéines intracellulaires des jonctions adhérentes comme VAP-33 (VAMP associated protein) (Lapierre *et al.*, 1999). Cette protéine serait capable de réguler la localisation de

l'occludine. La technique de double hybride a pu mettre en lumière d'autres partenaires potentiels cytoplasmiques de la molécule d'occludine comme la PKC- ζ (Protéine Kinase C- ζ), la tyrosine kinase c-YES et la protéine p85 (Nusrat *et al.*, 2000).

L'occludine n'est pas essentielle à la formation de la jonction serrée mais renforce la cohésion intercellulaire. En effet, les souris déficientes pour cette protéine présentent des jonctions serrées correctement formées (Saitou *et al.*, 2000). Cependant, ces souris montrent un retard de croissance postnatale et présentent de nombreuses anomalies au sein de plusieurs tissus (inflammation, calcification du cerveau, atrophies testiculaires). D'autres protéines de la jonction serrée seraient alors capables de compenser l'absence d'occludine.

c) Les JAM

Les molécules d'adhérence jonctionnelles (JAM) sont des protéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Le domaine extracellulaire est formé de deux boucles de type immunoglobuline, suivi d'un passage transmembranaire. Leur domaine intracellulaire leur permet d'interagir avec différentes protéines telles que ZO-1, AF-6 et ASIP (Agouti Signaling Protein). Ce sont des protéines localisées à la jonction intercellulaire des cellules endothéliales mais également de certains épithélia polarisés. Les cellules circulantes comme les leucocytes et les plaquettes expriment également cette molécule. Il existe 3 types de JAM : JAM-A, -B et -C (Bazzoni, 2003).

Les molécules JAM exercent des interactions homophiliques, mais peuvent s'associer à d'autres protéines, notamment les intégrines présentes à la surface des cellules du système immunitaire comme les leucocytes. Ainsi, JAM-A permet l'adhésion du leucocyte sur la cellule endothéliale et facilite ainsi la transmigration leucocytaire. De plus, les protéines JAM sont également capables d'induire l'activation plaquettaire en les immobilisant à la surface des cellules endothéliales stimulées par des agents pro-inflammatoires.

d) La protéine ZO-1

Ce sont Stevenson et ses collaborateurs qui en 1986 ont découvert ZO-1, la première protéine associée aux jonctions serrées (Stevenson *et al.*, 1986). ZO-1 se lie au domaine cytoplasmique C-terminal des claudines, de l'occludine et de JAM-A (Stevenson *et al.*, 1986; Gumbiner *et al.*, 1991; Haskins *et al.*, 1998). Les protéines de la famille ZO, dont ZO-1, interagissent avec la F-actine (Itoh *et al.*, 1997; Fanning *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1999;

Wittchen *et al.*, 1999; Fanning *et al.*, 2002), présente du côté cytoplasmique des jonctions serrées (Madara, 1987).

Dans les cellules épithéliales, les protéines ZO-1 (ou ZO-2) sont requises pour la formation de jonctions serrées par les claudines (Umeda *et al.*, 2006). En effet, la perturbation de ZO-1 et la déplétion en ZO-2 entraîne une déficience dans la formation des jonctions serrées dans des cellules épithéliales murines (Umeda *et al.*, 2006). La déplétion de ZO-1 dans des cellules épithéliales MDCK provoque un retard dans la formation des jonctions serrées (Umeda *et al.*, 2004; McNeil *et al.*, 2006).

De plus, ZO-1 est requise pour l'activation de Rac1, et ZO-1 et ZO-2 sont requises pour le recrutement de la myosine II durant la formation des jonctions adhérentes (Ikenouchi *et al.*, 2007; Yamazaki *et al.*, 2008).

Il apparaît donc que ZO-1 ne soit pas exclusivement impliquée dans la formation des jonctions serrées mais également dans plusieurs étapes de l'adhésion cellule-cellule *via* les jonctions adhérentes et les jonctions serrées ainsi que dans leur ségrégation physique à la membrane.

C) La jonction adhérente (AJ)

1) Présentation

Les jonctions adhérentes forment des ceintures d'adhérence au pôle apical des cellules assurant un ancrage fort des cellules entre elles ainsi qu'au cytosquelette d'actine. Ces jonctions renforcent non seulement la cohésion mécanique des tissus, mais permettent également la contraction d'un anneau d'actine apical à l'origine de nombreux mouvements morphologiques au cours de l'embryogenèse. Les molécules clés de la jonction adhérente sont représentées par des molécules de la famille des cadhérines.

Les cadhérines constituent une large famille de glycoprotéines localisées à la surface des cellules. La plupart d'entre elles participent à des adhérences dépendantes du calcium. Elles jouent un rôle clé dans la formation des tissus solides (Takeichi, 1995; Tepass, 1999) et leur expression sélective est finement régulée au cours du développement embryonnaire (Radice *et al.*, 1997; Stepniak *et al.*, 2009). De plus, leur fonction adhésive est sélective. En effet, lorsque différents types de cellules sont mélangés, les cellules de même type sont capables de s'assembler. Ces interactions sont dites homotypiques. Cette association cellulaire se fait en fonction du sous-type de cadhérine qu'elles expriment. Les cellules forment ainsi

des liaisons homophiliques (Takeichi, 1990). Chez les vertébrés, les cadhérines sont au nombre de 100, divisées en sous-familles.

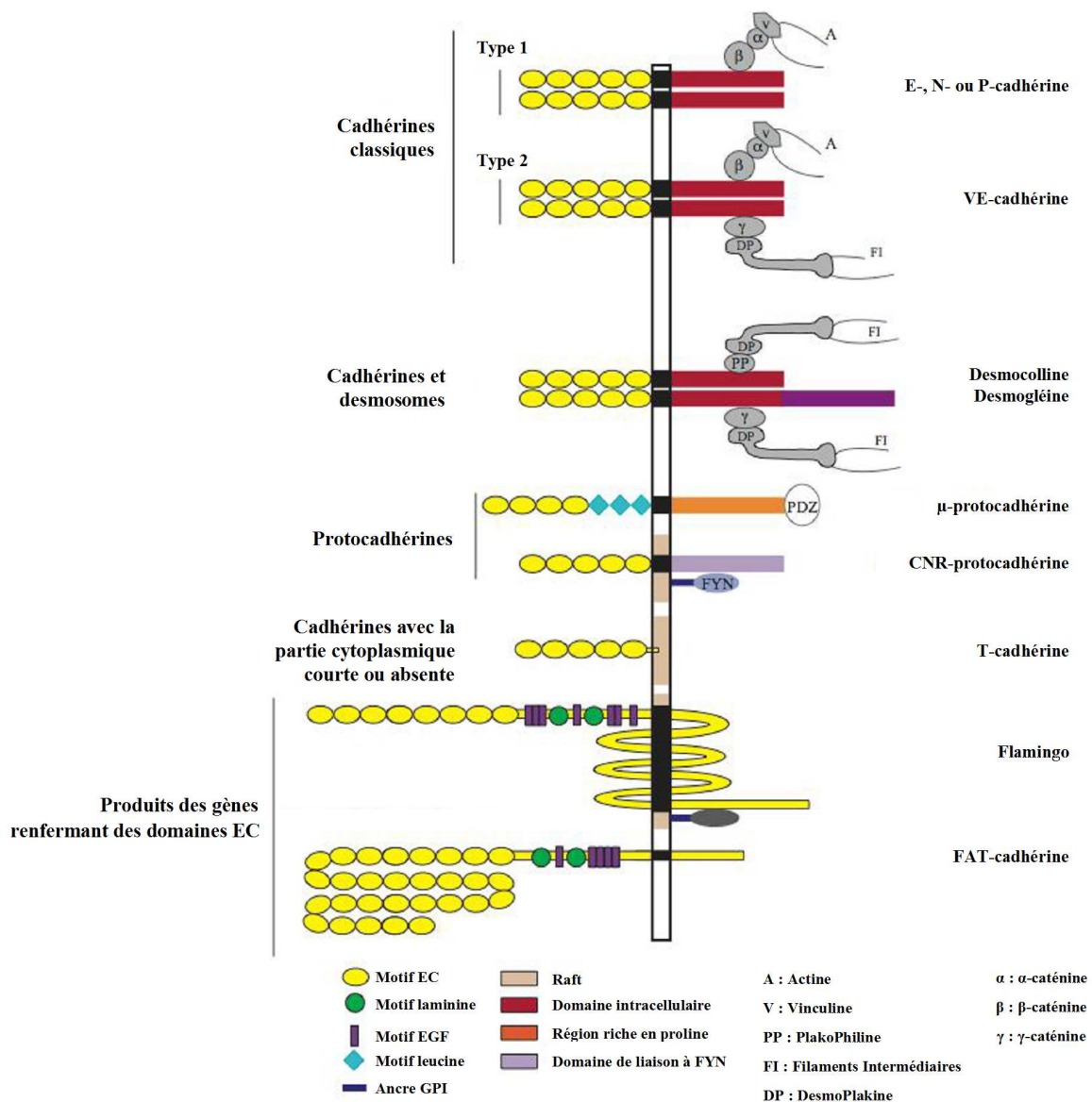


Figure I22 : La superfamille des cadhérines.

Les six sous-familles appartenant à la super famille des cadhérines sont représentées. Les cadhérines classiques se divisent en deux sous types : le type I et le type II. Elles sont reliées au cytosquelette d'actine par des partenaires cytoplasmiques et peuvent être également reliées aux filaments intermédiaires. Elles présentent 5 domaines répétés de type cadhérine (EC1 à 5). La cadhérine desmosomale présente des similarités avec la cadhérine classique et est connectée aux filaments intermédiaires. Les protocadhérines ne possèdent pas d'interaction avec le cytosquelette. Certaines cadhérines peuvent être enchâssées aux radeaux lipidiques comme les cadhérines dépourvue de partie cytoplasmique. Les cadhérines Flamingo et les cadhérines FAT possèdent de nombreux domaines extracellulaires répétés (EC) ainsi que des motifs EGF et laminine.

D'après Angst et al., 2001.

La partie extracellulaire d'une cadhérine est caractérisée par la présence de plusieurs domaines répétés d'environ cent dix acides aminés. Ce motif, nommé ectodomaine (ou EC),

se présente sous la forme d'un module de type immunoglobuline et peut être répété entre cinq et trente fois. Une protéine est désignée comme cadhérine si elle possède ce module. La superfamille des cadhérines se compose donc de diverses protéines structurellement différentes. Nollet et collaborateurs ont proposé de classer les cadhérines en six sous-familles.

Ce classement se base sur l'analyse phylogénique de la séquence du domaine EC1. Parmi toutes les cadhérines, ce domaine est très conservé (Nollet *et al.*, 2000). Les six sous-familles de cadhérines (Fig. I22) sont les cadhérines classiques (de type I ou II), les cadhérines desmosomales, les protocadhérines, les cadhérines à ancre GPI (glycosyl-phosphatidylinositol), les cadhérines de type Flamingo et les FAT cadhérines.

2) Les cadhérines classiques

Ce sont les cadhérines les plus étudiées. La séquence peptidique du domaine EC1 a permis de les classer en deux sous-types. Les principales cadhérines classiques de types I sont représentées par les E-, N- et P-cadhérines. La VE-cadhérine, quant à elle, est une cadhérine de type II.

a) Organisation et assemblage

Les cadhérines classiques sont formées d'un domaine extracellulaire composé de 5 domaines EC (Fig. I23). Ce domaine possède des sites de liaison au calcium, qui stabilise la cadhérine et permet l'interaction entre les différentes molécules de cadhérines. Le domaine extracellulaire est suivi d'un domaine transmembranaire à un seul passage qui est lui-même suivi d'un domaine intracellulaire. Le domaine intracellulaire interagit avec diverses protéines. Les partenaires protéiques préférentiels de ce domaine sont les caténines, ce qui permet aux cadhérines d'être liées au cytosquelette d'actine.

Le domaine EC1 est le principal domaine responsable de la capacité adhésive des molécules de cadhérine. Toutes les cadhérines de type I comportent au sein de leur domaine EC1 en position C-terminal une séquence tripeptidique conservée : Histidine-Alanine-Valine (HAV). Cette séquence a longtemps été considérée comme la zone moléculaire de la cadhérine permettant l'adhérence cellulaire (Blaschuk *et al.*, 1990). Les cadhérines de type II, comme la VE-cadhérine, ne possèdent pas cette séquence (Vincent *et al.*, 2004). De plus, le module EC1 possède un résidu tryptophane-2 (Trp-2) qui va pouvoir se loger dans la poche hydrophobe portée par le module EC1 de la molécule de cadhérine adjacente. De cette manière, la liaison homophile peut être créée (Shapiro *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 1998;

Boggon *et al.*, 2002; Shapiro & Weis, 2009). Ce modèle nommé « strand-swap » (échange de brin) représente le modèle d'interaction entre deux molécules de cadhérine le mieux décrit. Les cadhérines de type II présentent également ce type d'interaction mais possèdent un résidu tryptophane additionnel appelé Trp-4, qui s'insère dans une autre poche hydrophobe portée par le domaine EC1 de la molécule de cadhérine adjacente (Patel *et al.*, 2006). L'interaction entre les domaines EC1 de deux molécules de cadhérines voisines est de faible affinité et se forme au début du contact intermoléculaire (Sivasankar *et al.*, 2001). La présence ou non d'ions calcium régit l'interaction soit en *trans* (entre deux domaines extracellulaires de deux cellules adjacentes), soit en *cis* (entre deux domaines extracellulaires d'une même cellule) (Shapiro & Weis, 2009). En effet, en absence de calcium, les ectodomaines de cadhérines d'une même cellule perdent leur rigidité et peuvent s'associer entre eux (Pokutta *et al.*, 1994; Chitaev & Troyanovsky, 1998). *A contrario*, lorsque le calcium est fixé à son domaine de liaison, cette interaction induit une modification de la courbure de la cadhérine, ce qui facilite l'interaction de la cadhérine avec la cadhérine voisine (Boggon *et al.*, 2002).

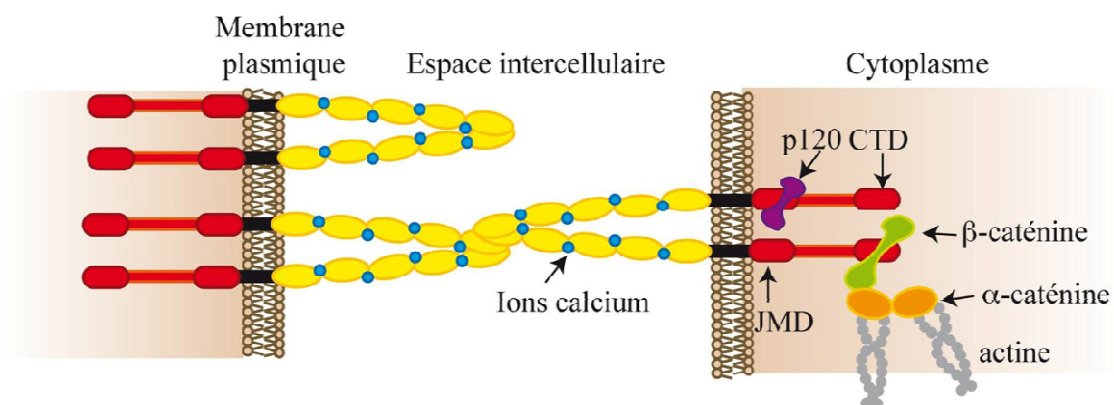


Figure I23 : Représentation de cadhérines classiques.

Les cadhérines classiques possèdent un domaine extracellulaire formé de 5 domaines répétés (jaune). Chaque domaine possède un domaine de liaison au calcium (en bleu). Le domaine transmembranaire à un seul passage permet aux cadhérines d'être enchâssées à la membrane. Le domaine cytoplasmique permet la liaison aux caténines. p120 interagit avec les cadhérines classiques grâce au domaine JMD (Juxta Membrane Domain). La β -caténine se lie au domaine CTD (C-Terminal binding Domain). La γ -caténine (non représentée) se lie également au domaine CTD et permet de relier la cadhérine aux filaments intermédiaires. L' α -caténine permet de relier la cadhérine au cytosquelette d'actine.

D'après Paredes et al., 2007.

Les cadhérines, assemblées entre elles, forment ensuite des structures « zippées » le long de la jonction adhérente (Nose *et al.*, 1988; Shapiro *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2005a; Patel *et al.*, 2006). Bien que les cadhérines assurent essentiellement des interactions homophiliques, certaines cadhérines classiques peuvent interagir avec d'autres types de molécules mais cette capacité reste exceptionnelle. La E-cadhérine, par exemple, peut se lier aux intégrines $\alpha E\beta 7$ et

$\alpha\beta 1$ (Cepek *et al.*, 1994; Takeichi, 1995). La N-cadhérine peut interagir avec le récepteur au FGF (Williams *et al.*, 1994).

b) Partenaires cytoplasmiques : les caténines

La partie cytoplasmique des cadhérines permet l'interaction avec des partenaires comme les caténines. La β - et γ -caténine sont en interaction directe avec la cadhérine et se lient au niveau de la région C-terminale du domaine cytoplasmique appelée CTD (C-Terminal Domain). L' α -caténine se lie à la β -caténine et l'ensemble du complexe est relié au cytosquelette d'actine. Ce complexe ancre la cadhérine de manière stable à la membrane. Cependant, l'association du cytosquelette d'actine au complexe cadhérine/ β -caténine/ α -caténine est depuis peu remise en question. En effet, des études ont montré que l' α -caténine ne peut pas être associée simultanément au cytosquelette d'actine et à la β -caténine (Gates & Peifer, 2005; Yamada *et al.*, 2005; Pokutta *et al.*, 2008), ce qui impliquerait la participation de molécules adaptatrices entre l' α -caténine et l'actine. Il a été proposé que l'eplin puisse jouer ce rôle et constituer un lien entre l' α -caténine et l'actine (Abe & Takeichi, 2008). La région la plus proximale du domaine cytoplasmique lie la caténine p120 au niveau d'une région appelée JMD (Juxta Membrane Domain).

i) La β -caténine

La β -caténine est une caténine très conservée au cours de l'évolution et se compose de 12 motifs répétés de types Armadillo (Peifer *et al.*, 1992). La β -caténine peut être transloquée des jonctions vers le noyau où elle peut s'associer à des facteurs de transcription et réguler ainsi l'expression de gènes cibles. Ainsi, l'association de la β -caténine aux cadhérines classiques permet de réguler le pool de β -caténine libre, ce qui constitue un moyen de réguler l'expression génique. La β -caténine peut réguler l'expression de certains gènes, elle est par exemple une molécule clé dans la voie de signalisation Wnt. Les molécules Wnt sont des facteurs de croissance et de différenciation fondamentaux au cours du développement embryonnaire. En absence de signal Wnt, la β -caténine cytosolique est phosphorylée par le complexe protéique constitué de la Glycogène Synthase Kinase (GSK) et de l'Adenomatous Polyposis Coli (APC). La β -caténine alors phosphorylée, est rapidement polyubiquitinylée et dégradée. En revanche, l'association de certains Wnts à leurs récepteurs inhibe le complexe de phosphorylation contenant la GSK. De cette manière, la β -caténine n'est plus dégradée et s'accumule alors dans le cytoplasme. Cette β -caténine libre peut se délocaliser vers le noyau

et lier les facteurs de transcription de la famille T-Cell Factor (TCF)/Lymphocyte Enhancing Factor (LEF). Ce phénomène entraîne la transcription de nombreux gènes impliqués dans divers processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation (Porfiri *et al.*, 1997). Chez l'adulte, cette voie de signalisation peut être de nouveau activée et conduit à la progression tumorale.

ii) La γ -caténine

La structure de la γ -caténine est très proche de celle de la β -caténine. Elle permet, grâce à la desmoplakine, de relier les cadhérines aux filaments intermédiaires. Le rôle exact de la γ -caténine est encore à l'heure actuelle incertain. Elle serait cependant, comme la β -caténine, impliquée dans la régulation de la prolifération et assurerait ainsi un rôle de cofacteur transcriptionnel (Barker & Clevers, 2000; Maeda *et al.*, 2004; Shimizu *et al.*, 2008).

iii) La caténine p120

La caténine p120 a d'abord été décrite comme étant un substrat de la tyrosine kinase Src, et a été par la suite décrite comme partenaire cytoplasmique pouvant s'associer au domaine JMD des cadhérines. Le rôle majeur de p120 dans le complexe protéique à base de cadhérine est de maintenir la stabilité et la localisation membranaire des cadhérines (Ireton *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003). En effet, en absence de p120, la plupart des cadhérines sont internalisées puis dégradées. Notamment, dans des cellules épithéliales, la caténine p120 protègerait la E-cadhérine de la dégradation protéique en masquant le domaine de liaison pour Hakai : une E3 ubiquitine ligase (Fujita *et al.*, 2002). Par ces mécanismes, p120 régulerait donc la demi-vie de la cadhérine à la membrane. De la même manière que les autres cadhérines, la VE-cadhérine membranaire serait stabilisée à la jonction grâce à p120. La caténine empêcherait la VE-cadhérine d'entrer dans des voies d'endocytose dépendante de la clathrine et d'être par la suite dégradée dans le lysosome (Xiao *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2005; Chiasson *et al.*, 2009).

En outre, p120 module la forme de la cellule en régulant l'activité des protéines de type Rho-GTPase comme RhoA, Rac1 et Cdc42 (Anastasiadis, 2007). Ces trois protéines sont importantes dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine. La VE-cadhérine régulerait ainsi cette fonction associée à p120, en séquestrant cette caténine. p120 permet également l'association des cadhérines aux microtubules. Bien que cette association soit beaucoup moins connue et caractérisée que l'association des cadhérines au cytosquelette d'actine, elle permettrait de stabiliser les cadhérines à la membrane (Waterman-Storer *et al.*,

2000; Stehbens *et al.*, 2006). De plus, l'association de p120 aux microtubules participerait à l'organisation membranaire des cadhérines en les transportant à la membrane plasmique à l'aide de moteurs moléculaires (Mary *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Stehbens *et al.*, 2009).

Par ailleurs, p120 serait aussi impliquée dans la régulation de l'expression génique et le contrôle du cycle cellulaire. Tout d'abord, p120 possède des séquences d'adressage NLS (Nuclear Localization Signal) et d'export NES (Nuclear Export Signal), et peut donc être transloquée dans le noyau. Une fois à l'intérieur du noyau, p120 s'associe au facteur de transcription Kaiso (Daniel & Reynolds, 1999). Ce facteur de transcription a été décrit comme pouvant réguler négativement les gènes cibles induits par le couple de facteur β -caténine/TCF suite à l'activation de la voie de signalisation Wnt. Or, le site de liaison de Kaiso à l'ADN se superpose au domaine de liaison de p120. Ainsi, p120, associée au facteur Kaiso, empêcherait ce dernier de s'associer à ses gènes cibles. De cette manière, p120 inhiberait donc la fonction de facteur de transcription de Kaiso et régulerait l'expression génique (Daniel, 2007). De plus, p120 participerait à la progression du cycle cellulaire. En effet, au cours de la progression du cancer colorectal, cette caténine est capable d'interférer avec le cycle cellulaire en se liant et en stabilisant la cycline E. Ce complexe induirait la prolongation de la phase S ainsi que la synthèse de centrosomes surnuméraires provoquant la polyploïdie (Chartier *et al.*, 2007). Ces résultats montrent donc que p120 exerce un rôle actif dans la synthèse d'ADN soit en interférant avec la fonction du facteur de transcription Kaiso ou en arrêtant le cycle cellulaire suite à son action stabilisatrice envers la cycline E.

c) La E-cadhérine

La E-cadhérine est le constituant majeur des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales. Elle reste incontestablement la cadhérine classique de type I la plus étudiée au vue de son importance au cours de processus physiologiques. En effet au cours de l'embryogenèse, mais également au cours de la progression tumorale, elle participe à un mécanisme cellulaire majeur : la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, Epithelial-Mesenchymal Transition). Ce mécanisme se caractérise par un « switch » d'expression de la E-cadhérine. La baisse d'expression et la perte de la localisation jonctionnelle de cette cadhérine est associée à un changement phénotypique de la cellule épithéliale, qui présente alors des marqueurs de type mésenchymateux (Behrens *et al.*, 1989). La cellule devient alors plus invasive. Au cours de l'EMT, la régulation négative de la E-cadhérine s'accompagne

d'une augmentation de l'expression d'une autre cadhérine classique : la cadhérine neurale ou N-cadhérine.

Dans les cellules épithéliales MDCK, Rac1 colocalise avec la E-cadhérine au niveau des jonctions cellule-cellule alors qu'il est transloqué dans le cytosol lorsque les jonctions sont perturbées par chélation du Ca^{2+} avec de l'EGTA (Nakagawa *et al.*, 2001). Il a aussi été rapporté que les adhésions cellule-cellule médiées par la E-cadhérine stimulent l'activité de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) dans les MDCK (Pece *et al.*, 1999). De plus, il a été montré que la PI3K interagit avec la E-cadhérine (Pece *et al.*, 1999) et la β -caténine (Espada *et al.*, 1999). Du fait que la PI3K agisse en amont de Rac1 (Kotani *et al.*, 1994), il y a une implication possible de la PI3K dans l'activation de Rac1 dépendante de la E-cadhérine. En effet, la wortmannine, un inhibiteur de la PI3K, inhibe l'activation de Rac1 induite par la E-cadhérine mais n'affecte pas leur localisation cellulaire (Nakagawa *et al.*, 2001).

Les GTPases de la famille Rho, une fois activées, affectent le niveau d'expression de la E-cadhérine à la membrane, probablement en régulant le transport endocytaire (Mosesson *et al.*, 2008).

Le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine s'associe avec les protéines α -, β -, et γ -caténine qui relie la E-cadhérine au cytosquelette d'actine (Ozawa *et al.*, 1989).

d) La P-cadhérine

L'existence de cette cadhérine a été mise en évidence en 1986, par l'équipe de Takeichi, dans des cellules de souris qui n'exprimaient ni la E-, ni la N-cadhérine mais qui avaient cependant la capacité de s'agréger entre elles (Nose & Takeichi, 1986). La P-cadhérine est fortement exprimée dans le placenta de souris alors que le placenta humain en est dépourvu (Shimoyama *et al.*, 1989). Au cours du développement embryonnaire chez la souris, elle est exprimée de manière transitoire dans différents tissus et joue un rôle dans la morphogénèse et l'implantation embryonnaire (Hirai *et al.*, 1989a, b; Wakita *et al.*, 1998). Elle est exprimée de manière permanente au sein de l'épiderme, le mésothélium ainsi que dans l'endothélium de la cornée (Nose & Takeichi, 1986). Chez l'homme et la souris, la P-cadhérine permet la progression de la différenciation terminale de l'épiderme. En effet, bien que co-exprimée avec la E-cadhérine dans les cellules épithéliales, elle s'observe uniquement au sein des cellules épithéliales prolifératives se situant dans la couche basale de la majorité des épithélia stratifiés de l'épiderme et des follicules pileux.

La P-cadhérine est impliquée dans le maintien de la croissance cellulaire et dans le maintien de l'état indifférencié de la cellule. En effet, son expression est altérée dans de nombreux cancers. Les premières études réalisées ont montré que des jeunes souris femelles déficientes en P-cadhérine présentaient une différenciation précoce de la glande mammaire et développaient avec l'âge des hyperplasies et des dysplasies (Daniel *et al.*, 1995).

Cette cadhérine constitue également un indicateur fiable de mauvais pronostic chez des patientes atteintes de cancer du sein (Paredes *et al.*, 2005). En effet, elle est surexprimée dans ce type de cancer et est suffisante pour induire un phénotype migratoire et invasif à la cellule. Cette capacité invasive s'explique par une surexpression de facteurs pro-invasifs comme les métalloprotéases MMP-1 et -2 (Matrix MetalloProteinases) (Ribeiro *et al.*, 2010). MMP-1 est connue pour dégrader la matrice extracellulaire, et facilite l'invasion tumorale et la formation de foyer métastatique. MMP-1 et 2 sont aussi capables de cliver la P-cadhérine ce qui corrèle avec l'augmentation de la capacité invasive de la cellule tumorale (Ribeiro *et al.*, 2010).

e) La N-cadhérine

La N-cadhérine a été mise en évidence dans les tissus neuronaux en 1989 (Lagunowich & Grunwald, 1989). Mais cette cadhérine n'est pas exclusivement neuronale. En effet, elle est également exprimée dans des cellules qui ont une origine mésodermique (muscle, endothélium) (Knudsen *et al.*, 1990; Salomon *et al.*, 1992). Elle se localise préférentiellement au niveau des jonctions adhérentes. Cependant, au sein des cellules endothéliales, sa localisation est originale, car elle est présente de manière diffuse autour de la membrane (Salomon *et al.*, 1992). Cette localisation, atypique pour une cadhérine, pourrait lui valoir des fonctions spécifiques au sein des cellules endothéliales.

La N-cadhérine est fondamentale au cours du développement embryonnaire, notamment au cours du développement cardiaque. En effet, les souris déficientes en N-cadhérine meurent à 10 jours de gestation à cause de défauts cardiaques majeurs (Radice *et al.*, 1997). De plus, les tubes neuronaux et les somites de ces embryons présentent des malformations et l'organisation épithéliale des somites est perturbée. Cependant tous les tissus susceptibles d'être formés à ce stade de développement sont présents et semblent être normalement différenciés.

Objectifs

Plusieurs résultats préliminaires obtenus par notre groupe suggéraient que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ pourraient jouer un rôle important dans la mucoviscidose. Ces deux protéines ont d'abord été identifiées par spectrométrie de masse dans des fractions microsomales enrichies en réticulum endoplasmique, lieu de dégradation de la forme immature de la protéine CFTR sauvage et muté (F508del). Leur inhibition indirecte ralentissait la dégradation de CFTR, laissant supposer une implication dans le renouvellement de cette protéine. Par ailleurs, l'étude bibliographique concernant $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ montre qu'en plus de leurs rôles comme second messenger, ces deux protéines ont aussi des rôles directs dans de nombreux processus cellulaires, comme le développement et le maintient du complexe jonctionnel à l'échelle des cellules épithéliales rénales (Fig. O1).

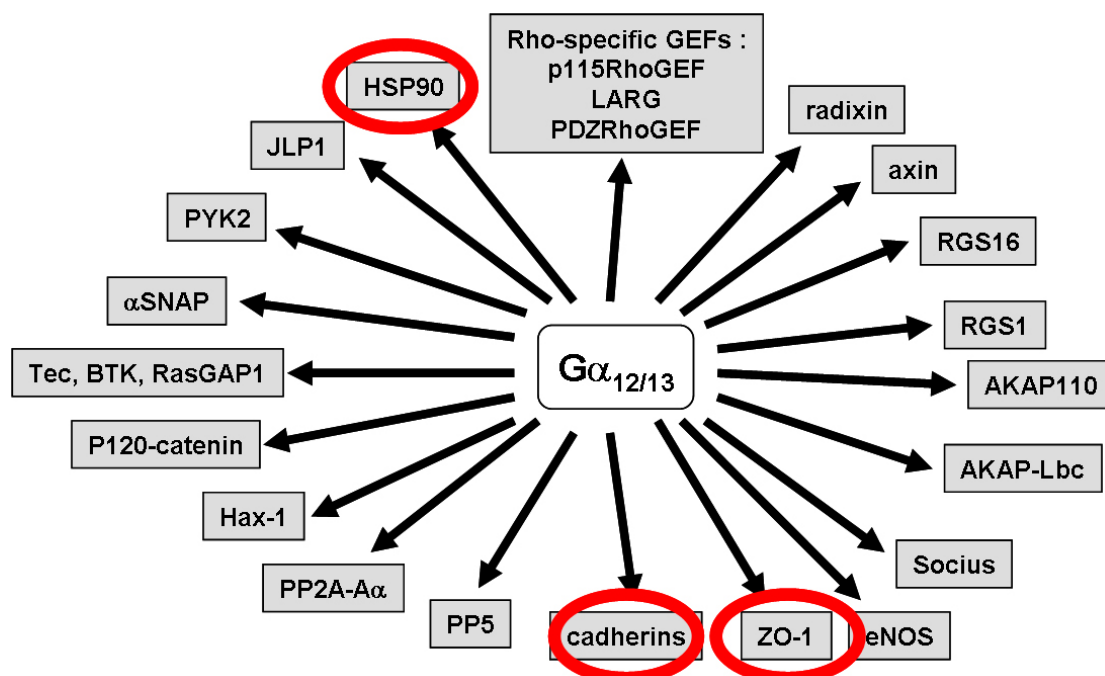


Figure O1 : Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ agissent sur de nombreuses protéines.

D'après Kelly et al., 2007.

A l'échelle cellulaire, la mucoviscidose se caractérise principalement par :

- La perte de la sécrétion apicale des ions Cl^- , qui peut être la conséquence du blocage et de la dégradation rapide au niveau du RE de la protéine CFTR mutée mais fonctionnelle, comme dans le cas de la mutation F508.
- Une diminution de la résistance transépithéliale, synonyme de la perte de la barrière luminale, qui a pour conséquence la propagation de l'infection vers le côté basolatéral, entraînant l'exacerbation de la réponse inflammatoire au niveau de l'épithélium pulmonaire.

A la lumière de l'ensemble de ces données expérimentales et bibliographiques, mon travail de thèse a porté sur la caractérisation des rôles des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de CFTR sauvage et mutée, et dans le développement et le maintien des complexes jonctionnels des cellules épithéliales pulmonaires.

L'ensemble de mes résultats sera présenté sous forme de deux parties correspondant à deux publications qui sont en cours de rédaction.

La première partie traitera du rôle de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de la protéine CFTR. La deuxième partie portera sur l'implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans l'instauration et le maintien des jonctions cellulaires, plus précisément les jonctions serrées et adhérentes, dans des cellules épithéliales bronchiques saines et mucoviscidiques.

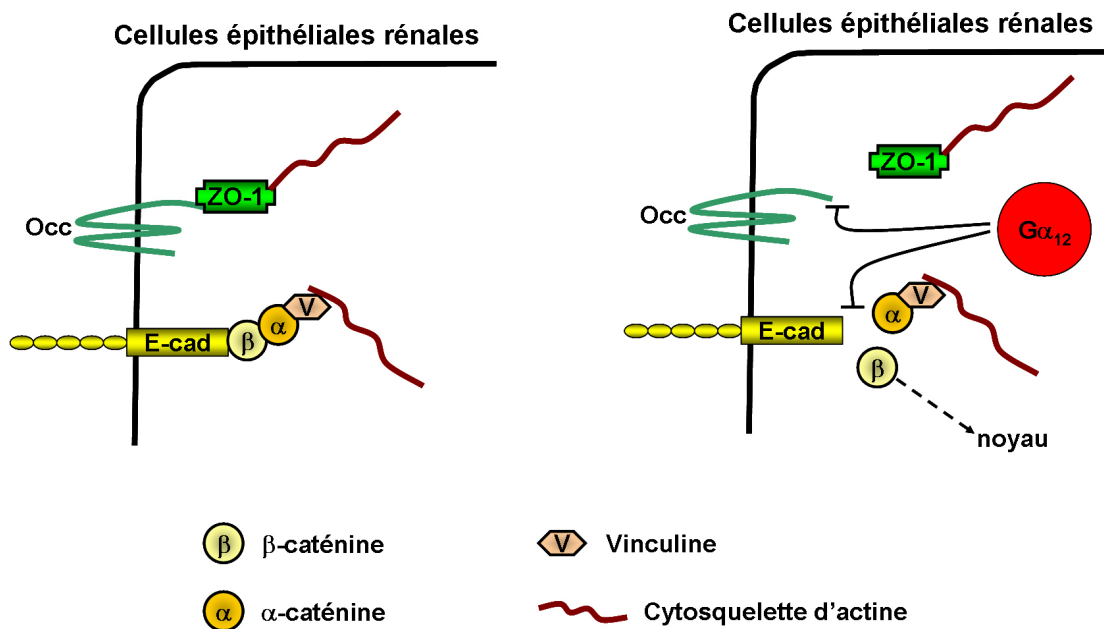


Figure O2 : Rôle des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les complexes jonctionnels des cellules épithéliales rénales.

La plupart des études publiées à ce jour ont été réalisées sur les cellules rénales canines MDCK, où les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ déstabilisent les jonctions serrées et adhérentes.

Matériel
et
Méthodes

I) Produits utilisés

2-désoxy-D-glucose : *Sigma*

β-mercaptoéthanol : *Roth*

Acétate kinase : *Sigma*

Acétyle phosphate : *Sigma*

AlCl₃ : *Sigma*

Antibiotiques (culture cellulaire) : Pénicilline, Streptomycine, Amphotericine B, *Sigma*

Antibiotiques (bactériologie) : Ampicilline, Kanamycine, *Sigma*

Antimycine A : *Sigma*

ARN interférents : *Ambion*

BES : *Sigma*

BFA : *Sigma*

BSA : *Sigma*

Ca(NO₃)₂ : *Sigma*

Caméra du microscope inversé à fluorescence : AxioCam MRm, *Zeiss*

CHX : *Sigma*

CTX : *Sigma*

D_c protein assay : *Bio-Rad*

Deoxycholate de sodium : *Sigma*

Digitonine : *Fluka*

DMEM + GlutaMAX + 4,5 g/l D-glucose + pyruvate : *Gibco*

DMEM/F-12 : *Gibco*

DMEM/F-12 sans méthionine ni cystéine : *Invitrogen*

DMSO : *Sigma*

dNTP : *MP biomedical*

DPBS : *Sigma*

EDTA : *Sigma*

Electrode à iode : *WTW*

Film Kodak : Kodak BioMax MS film, *Kodak*

Formaline : *Sigma*

Forskoline : *Sigma*

FuGENE 6 : *Roche*

G418 : *Sigma*

GA : *Sigma*

Glucose : *Sigma*

Glycine : *Bio-rad*

GTPγS : *Sigma*

H₂O₂ : *Sigma*

HEPES : *Sigma*

HiPerfect : *Qiagen*

IBMX : *Sigma*

ImageJ : *NIH*

Iodoacétamide : *Sigma*

Kit Duolink : *Olink*

Kit ECL Western Blotting : *Amersham Biosciences*

Kit extraction ARN : RNeasy mini kit, *Quiagen*

Kit GeneClean Turbo : *MP Biomedicals*

Kit GoTaq qPCR Master Mix : *Promega*

Kit immunohistochimie : Vectastain ABC kit, *Vector laboratories*

Kit minipreps : QIAprep, *Qiagen*
Kit reverse transcription ARN : GoScript™ Reverse Transcription System, *Promega*
KNO₃ : *Sigma*
Kodak BioMax : *Kodak*
Lac : *Sigma*
Lait écrémé : *Régilait*
LB : *Sigma*
LB-Agar : *Sigma*
Lecteur de microplaque : *TECAN*
Leupeptine/Pepstatine : *Sigma*
MEM : *Gibco*
Méthanol : *Fluka*
Methotrexate : *Sigma*
MG : *Sigma*
Microscope confocal : TCS SP2, *Leica*
Microscope inversé à fluorescence : Axiovert 200M, *Zeiss*
Milieu de montage : *Sigma*
Millicell®-ERS : *Millipore*
MPA : *Sigma*
Na₂CO₃ : *Sigma*
NaCl : *Sigma*
NaF : *Sigma*
NaI : *Sigma*
NaNO₃ : *Sigma*
Nanodrop : ND-1000, *Labtech*
Nitrocellulose : *Bio-Rad*
PBS : *Gibco*
Pfu : *Promega*
Phosphorimager : *Bio-Rad*
PMSF : *Sigma*
Protéines G Sépharose : *Sigma*
PTX : *Sigma*
Puromycine : *Sigma*
Quantity One : *Bio-Rad*
RPMI : *Gibco*
SDS : *Sigma*
SOC : *Invitrogen*
Soufre radioactif : PRO-MIX™ L-[³⁵S] *in vitro* cell labelling mix, *Amersham Biosciences*
Sucrose : *Sigma*
Sura : *Sigma*
SVF : *Gibco*
T4 DNA ligase : *Roche*
Tampon de ligation 5× : *Roche*
Thermocycleur : *Eppendorf*
Transwell : *Corning*
Tris-HCl : *Sigma*
Triton X-100 : *Euromedex*
Trypsine : *Gibco*
Xylène : *Carlo Erba reagents*

II) Biologie moléculaire

A) Les plasmides utilisés

Dans cette étude, nous avons utilisé les plasmides d'expression eucaryote pcDNA3.1 et pNUT codant pour les protéines CFTR sauvage (wt) ou mutée F508del étiquetées en position C-terminale par une étiquette HA (HémAgglutinine du virus *Influenza*, 11 acides aminés : YPYDVPDYANS). Dans ces plasmides, l'étiquette HA est située entre le dernier acide aminé de CFTR et le codon stop (Haardt *et al.*, 1999).

Toutes les vérifications avaient 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).

Le plasmide pcDNA3.1, dont l'agent de sélection dans les cellules eucaryotes est le G418 (Gentamicine, 0,2 mg/ml), a servi de matrice pour la génération des différentes constructions correspondantes aux protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, qui ont par la suite été transférées dans le plasmide pNUT pour la transfection stable. L'agent de sélection de ce dernier est le methotrexate (100 μ M).

Les mêmes constructions ont aussi été utilisées pour transférer les gènes d'intérêt dans le plasmide pEGFP, permettant de générer une protéine chimère, où notre protéine d'intérêt est couplée à la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) ou à un de ses dérivés (YFP = Yellow Fluorescent Protein ou CFP = Cyan Fluorescent Protein).

B) Méthodes courantes de biologie moléculaire

1) Purification de fragments d'ADN

Les fragments d'ADN obtenus par amplification PCR ou après digestions enzymatiques étaient purifiés grâce au kit GeneClean Turbo, selon les indications du fournisseur. Brièvement, dans un premier temps, les fragments d'ADN étaient séparés sur gel d'agarose 0,8% à 2% et les bandes correspondant aux fragments étaient isolées.

L'ADN était ensuite séparé de l'agarose par chauffage dans un bain possédant une forte concentration en sels chaotropiques. Le mélange était alors déposé sur une colonne de purification pour éliminer les sels et les autres contaminants. Après élution, les fragments étaient utilisables pour les étapes suivantes : PCR ou digestion et ligation.

2) Digestion

Dans le cadre de notre étude, nous avons dû digérer des fragments PCR et des plasmides à l'aide des enzymes de restriction NotI et XhoI, ou SacI et KpnI, dans le mélange réactionnel suivant :

- Fragment PCR ou plasmide : 200 ng
- Tampon de digestion (orange pour NotI/XhoI, jaune pour SacI/KpnI) 5x : 4 µl
- NotI (ou SacI) : 1 µl
- XhoI (ou KpnI) : 1 µl
- Eau stérile qsp 20 µl

3) Ligation

Pour les ligations, les quantités respectives de vecteur et d'insert digérés et purifiés étaient ajustées pour être dans un rapport moléculaire théorique de 1 pour 3 à 5, respectivement. Les réactions de ligation étaient effectuées comme décrit dans le protocole du fournisseur, dans le milieu réactionnel suivant :

- Vecteur digéré : x µl
- Tampon de ligation 5x : 4 µl
- Fragment digéré (insert) : y µl
- T4 DNA ligase : 1 µl
- Eau stérile qsp 20 µl

Le mélange réactionnel était incubé 30 min à 2 h à température ambiante, puis les plasmides ainsi générés étaient introduits pour amplification dans des bactéries compétentes par transformation.

4) Souche et culture bactérienne

Les bactéries *E. coli* DH5α, utilisées pour la production de plasmides, ont été cultivées en suspension dans du milieu LB (Lysogeny Broth) stérile à 37°C et sous agitation vigoureuse (200rpm). Pour les clonages, les bactéries compétentes transformées ont été étalées sur des boîtes de Pétri LB-Agar additionné de l'agent de sélection adéquat et incubées sur la nuit à 37°C.

5) Transformation bactérienne

La transformation est un phénomène naturel d'échange de matériel génétique entre deux bactéries. En laboratoire, la transformation artificielle, maîtrisée, est un phénomène couramment utilisé pour amplifier du matériel génétique à étudier. La méthode utilisée est décrite ci-dessous :

Entre 20 et 200 ng d'ADN d'intérêt (mélange de ligation ou plasmide à amplifier) étaient prélevés et mis en présence de 50 μ l de bactéries *E. coli* compétentes. Après incubation 30 min dans la glace, les bactéries étaient transformées par choc thermique de 40 s à 42°C puis de 3 min dans la glace. Les bactéries étaient alors diluées dans 350 μ l de milieu SOC (Super Optimized Culture) et incubées 1 h à 37°C sous agitation vigoureuse (200rpm) pour permettre l'expression du gène de résistance à l'antibiotique porté par le vecteur et ainsi faciliter la sélection des clones positifs. Ces précultures bactériennes étaient ensuite étalées sur des boîtes de Pétri contenant du LB-Agar additionné de la concentration adéquate d'antibiotique.

Les plasmides pCDNA3.1 et pNUT portent un gène de résistance à l'ampicilline, c'est donc cet antibiotique, à une concentration de 100 μ g/ml, qui a été utilisé pour sélectionner les bactéries positives. Pour les plasmides pEGFP, pECFP et pEYFP, la kanamycine à une concentration de 50 μ g/ml était utilisée.

Les boîtes étaient ensuite incubées sur la nuit à 37°C.

6) Purification d'ADN plasmidique

La purification des plasmides amplifiés à partir de cultures bactériennes a été réalisée par la technique de miniprep. La miniprep permet d'extraire l'ADN plasmidique par lyse alcaline grâce au kit QIAprep. Le principe repose sur une dénaturation différentielle de l'ADN génomique de structure relâchée et de l'ADN plasmidique superenroulé. Lorsque la soude est ajoutée au lysat cellulaire, seul l'ADN génomique est dénaturé de façon irréversible. L'addition d'acide et de sel permet la réassociation en réseau insoluble de l'ADN chromosomique, alors que l'ADN plasmidique reprend sa forme native soluble. Une centrifugation permet l'élimination d'une grande partie des protéines, de l'ARN et de l'ADN chromosomique. L'ADN plasmidique était alors précipité par de l'isopropanol, puis rincé par de l'éthanol à 70% et repris dans de l'eau stérile.

La concentration en ADN de la préparation était alors estimée au nanodrop par lecture de la densité optique à 260 nm. Le rapport DO_{260}/DO_{280} était aussi calculé, pour estimer la

pureté de notre préparation. Ce rapport doit être compris entre 1,6 et 2 pour que la préparation soit considérée comme correcte. L'ensemble des constructions portées par les plasmides ainsi purifiés était contrôlé par digestions enzymatiques et séquençage systématique.

C) Clonages par réaction de polymérisation en chaîne

Les amplifications d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées dans un thermocycleur sur des ADNc provenant d'une banque d'ADNc de poumons humains. L'ADN polymérase qui a été utilisée pour ces PCR est la Pfu issue de *Pyrococcus furiosus*. Elle possède une activité exonucléasique 3' vers 5' de correction des erreurs. Les conditions de PCR ont été établies selon les recommandations des fabricants. Les amorces d'ADN utilisées pour amplifier les fragments d'intérêts ont été synthétisées par la société Eurofins MWG Operon et sont listée dans le tableau M1.

Tableau M1 : Amorces utilisées pour le clonage de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.

$G\alpha_{12}$	forward	GCGGCCGCATGTCCGGGGTGGTGCGGACCC
	reverse	CTCGAGCTGCAGCATGATGTCCTTCAGG
$G\alpha_{13}$	forward	GCGGCCGCATGGCGGACTTCCTGCCGTCGC
	reverse	CTCGAGCTGTAGCATAAGCTGCTTGAGG

D) Mutagénèse dirigée

La mutagénèse dirigée consiste à introduire une mutation précise dans un gène d'intérêt. Pour ce faire, des amorces spéciales ont dû être utilisées (Tab. M2). Ces amorces doivent s'apparier à la séquence à muter et doivent posséder la mutation à effectuer.

Tableau M2 : Amorces utilisées pour la mutation de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.

$G\alpha_{12}$	forward	GGATGTGGGCGGCCTGCGGTCCCAGCGCCAGAAGTGG
	reverse	CCACTTCTGGCGCTGGGACCGCAGGCCGCCACATCC
$G\alpha_{13}$	forward	GGTTGATGTAGGTGGTCTGAGATCAGAAAGGAAACGTTGG
	reverse	CCAACGTTTCCTTTCTGATCTCAGACCACCTACATCAACC

Une PCR a ensuite été réalisée avec ces amorces et l'enzyme Pfu. Le mélange réactionnel était le suivant :

- 2 μ l de plasmide (20 ng)
- 1,25 μ l de chaque amorce diluée (62,5 ng final)
- 1,25 μ l dNTP mix (250 μ M final)

- 5 µl tampon Pfu 10x
- 1 µl Pfu
- 38,25 µl H₂O

Le programme PCR était le suivant :

- 1 min 95°C
- 18 cycles :
 - 1 min 95°C
 - 1 min 55°C
 - 2 min/kb 68°C
- 10 min 72°C

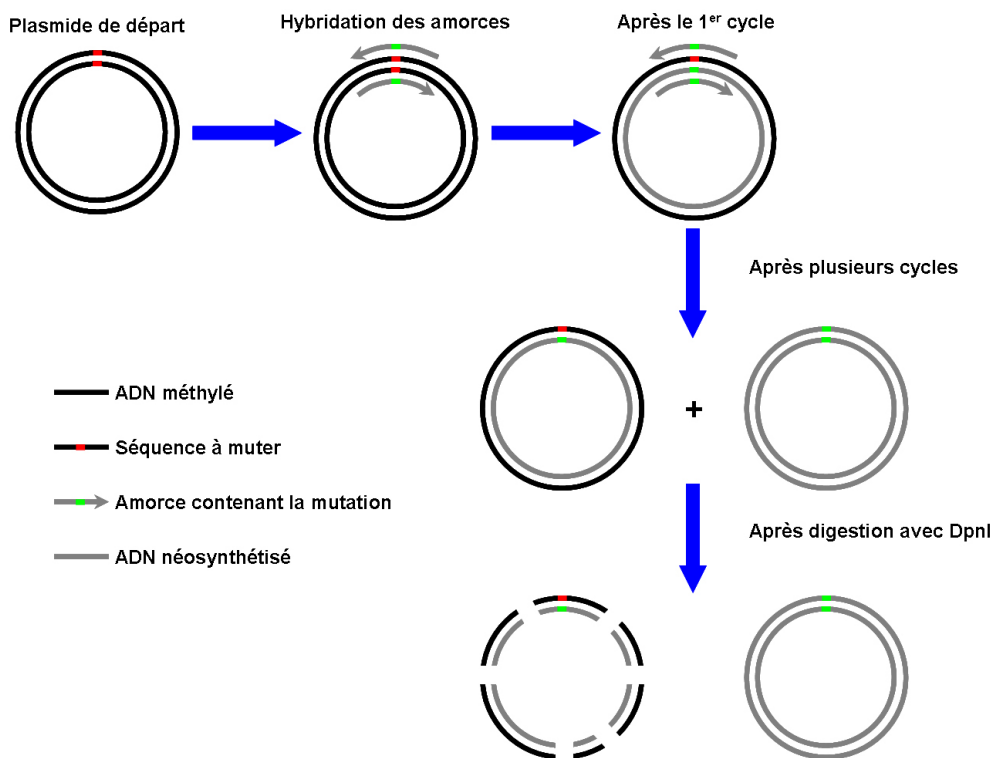


Figure M1 : Principe de la mutagenèse dirigée.

Une fois la PCR terminée, nous avons dans notre mélange les plasmides néosynthétisés comportant la mutation, mais aussi les plasmides de départ. Pour éliminer ces derniers, une digestion par l'enzyme DpnI était réalisée. En effet, cette enzyme ne cible que les ADN méthylés (fabriqués dans les bactéries). Pour ce faire, 1 µl de DpnI était ajouté au mélange, qui était incubé 1 h à 37°C.

Cette technique nous a permis d'introduire une mutation dans les gènes codants pour G α ₁₂ et G α ₁₃. Ces mutations consistaient à remplacer une glutamine (Q) par une leucine (L)

(mutation QL en position 231 pour $G\alpha_{12}$ et 226 pour $G\alpha_{13}$) dans leur site d'hydrolyse du GTP afin d'obtenir des protéines constitutivement actives (Meyer *et al.*, 2002).

E) Construction des outils moléculaires

Afin d'étudier le rôle des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de la protéine CFTR sauvage et F508del ainsi que dans l'instauration et le maintien des jonctions cellulaires, nous avons dû mettre au point un certain nombre de constructions.

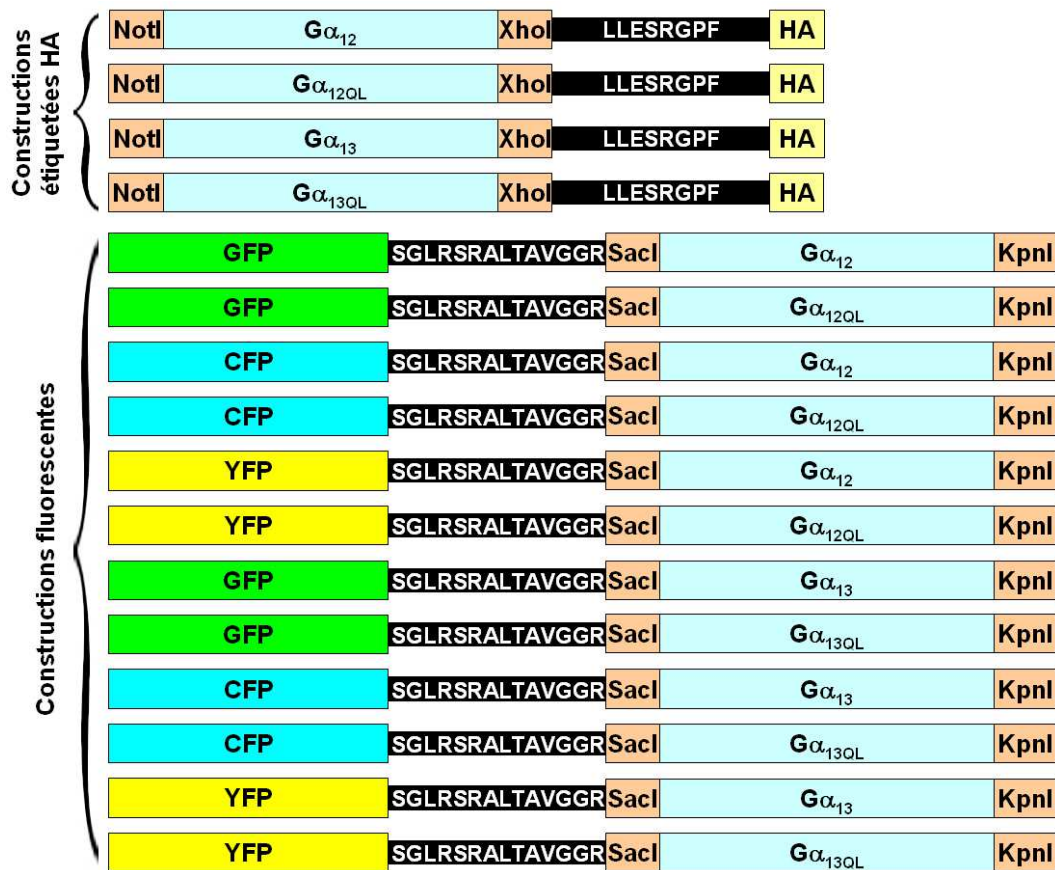


Figure M2 : Constructions moléculaires réalisées.

Les cadres oranges représentent les enzymes de restriction utilisées et les cadres noirs représentent la séquence peptidique du linker se situant entre le gène d'intérêt et l'étiquette utilisée.

Les gènes codant pour les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ ont tout d'abord été clonés par PCR à partir d'une banque d'ADNc de poumon humain (Matériel et Méthode II.C.). Les fragments PCR obtenus ainsi que le plasmide pCDNA3.1 contenant CFTR sauvage ont été digérés avec les enzymes de restriction NotI et XhoI, puis les fragments PCR ont été insérés dans le plasmide pCDNA3.1 par ligation (Matériel et Méthode II.B.2 et 3.). Après amplification et vérification des plasmides par analyse des séquençages, les gènes codant pour les protéines

$G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ ont été mutés (Matériel et Méthode II.D.), puis ces gènes mutés ainsi que les gènes sauvages ont été insérés dans les plasmides pNUT, pEGFP, pEYFP et pECFP (à l'aide des enzymes de restriction NotI et XhoI pour pNUT, et SacI et KpnI pour pEGFP, pEYFP et pECFP). Toutes les constructions obtenues sont représentées sur la figure M2.

III) Culture cellulaire

A) Lignées utilisées

1) 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 & 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) COS-7

La lignée COS-7 est une lignée fibroblastique d'origine rénale provenant du singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*). Elle a été obtenue après transformation par l'antigène T de SV40 (Simian Vacuolating Agent 40) muté au niveau de son origine de réplication (SV40 oridefective) pour éviter la réplication virale. Ces cellules sont surtout utilisées en imagerie car, du fait de leur étalement, elles permettent une excellente visualisation des différents compartiments intracellulaires. Elles sont aussi connues pour leur production accrue de protéines recombinantes par transfection transitoire.

3) COS-1

La lignée COS-1 a été obtenue de la même manière que la lignée COS-7 et constitue simplement un clone différent.

4) A549

Les cellules humaines de la lignée A549 sont des cellules alvéolaires dérivées d'adénocarcinome de poumon dont les caractéristiques ont été décrites par Lieber et collaborateurs en 1976 (Lieber *et al.*, 1976).

5) 16HBE14o-

Les cellules de la lignée 16HBE14o-, appelées HBE (Human Bronchial Epithelial cells) dans cette étude, sont des cellules bronchiques humaines transfectées par l'antigène T muté du Virus Simien 40. Les caractéristiques de ces cellules ont été décrites par Gruenert et collaborateurs en 1994 (Cozens *et al.*, 1994; Gruenert *et al.*, 1995).

6) CFBE41o-

Les cellules CFBE41o-, appelées CFBE (Cystic Fibrosis human Bronchial Epithelial cells) dans cette étude, sont l'équivalent mucoviscidosique des cellules HBE et présentent une mutation F508del homozygote pour le gène CFTR. Ces cellules ont également été décrites par Gruenert et collaborateurs (Kunzelmann *et al.*, 1993).

7) CFBE-wt

Les cellules CFBE-wt sont les cellules CFBE surexprimant de manière stable la protéine CFTR sauvage (Ilek *et al.*, 2008).

8) IB3-1

La lignée IB3-1 provient de cellules trachéales humaines transfectées par l'antigène T du Virus Simien 40 (Zeitlin *et al.*, 1991). Ces cellules sont hétérozygotes pour le gène CFTR (F508del/W1282X).

9) S9

Les cellules S9 sont les cellules IB3-1 ayant été corrigées par l'apport du gène *CF* sauvage (Egan *et al.*, 1992).

10) HEK-293

Les cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney fibroblast-like) sont des cellules adhérentes issues de tissus rénaux embryonnaires humains.

B) Condition de culture

Les cellules étaient maintenues en culture dans une boîte de 10 cm dans différents milieux contenant un mélange d'antibiotiques, dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂.

Pour les cultiver, les cellules BHK-21 ont été maintenue dans du DMEM/F-12 supplémenté par 5% de sérum de veau foetal (SVF), les cellules BHK-21 exprimant de manière stable des protéines marquées HA ont été maintenue dans ce même milieu supplémenté par 100 µM de methotrexate (0,2 mg/ml de G418 pour les protéines marquées GFP).

Les cellules Cos-7 et Cos-1 ont été maintenue dans du DMEM + GlutaMAX + 4,5 g/l D-glucose + pyruvate supplémenté par 10% de SVF.

Les cellules A549 ont été maintenue dans du RPMI pyruvate supplémenté par 10% de SVF.

Les cellules HBE et CFBE ont été maintenue dans du MEM supplémenté par 10% de SVF. Les cellules CFBE exprimant de manière stable CFTR sauvage ont été maintenues dans ce même milieu supplémenté avec de la puromycine (10 µg/ml).

C) Repiquage

Les cellules étaient repiquées à environ 90% de confluence. Pour cela, elles étaient lavées avec du DPBS (Dubelco's Phosphate Buffer Saline) sans calcium (Ca²⁺) ni magnésium (Mg²⁺), puis décollées par ajout de trypsine à 0,05% à température ambiante. La trypsine était ensuite inhibée par l'addition du Ca²⁺ présent dans le milieu de culture. Les cellules étaient alors resuspendues à l'aide d'une pipette stérile puis partagées dans des boîtes, de 10 cm ou 6 cm, ou dans des plaques 6 ou 12 puits.

D) Congélation

Après lavage au DPBS, décrochage des cellules adhérentes par la trypsine à 0,05% et resuspension de ces cellules dans du milieu de culture, celles-ci étaient centrifugées 2 min à 2000xg à température ambiante (TA). Le culot cellulaire était alors resuspendu dans le milieu

de congélation suivant : 10% DMSO (DiMéthylSulfOxyde), 20% SVF, et 70% du milieu de culture correspondant à la lignée à congeler.

Les cellules étaient par la suite placées à -80°C pendant environ 4 mois puis stockées dans de l'azote liquide (-180°C). La décongélation peut se faire à n'importe quel moment du processus.

E) Déplétions en ATP et en GTP

1) 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 contenait ni pyruvate, ni glucose (pour inhiber le CK), ni ATP. Ce milieu était additionné de 5 mM de 2-désoxy-D-glucose (inhibiteur du CK) et de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ 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.

2) Déplétion en GTP

La déplétion en GTP était obtenue en incubant les cellules dans un milieu de culture normal, en présence de 50 μM d'acide mycophénolique (MPA). 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 (Fig. M3).

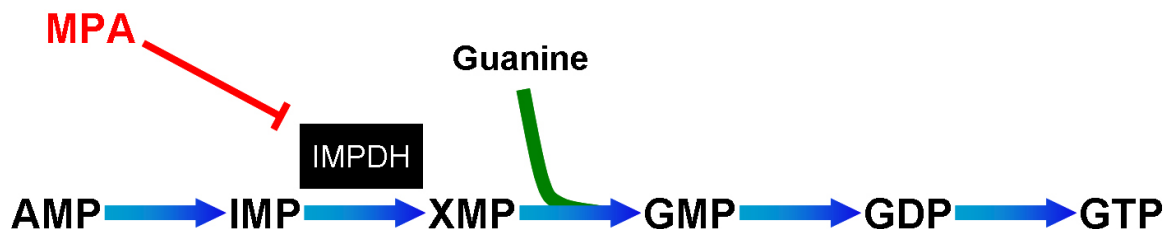


Figure M3 : Mode d'action du MPA.

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).

IV) Tissus bronchiques humains

Les tissus bronchiques humains ont été obtenus à partir de poumons humains sains ou mucoviscidosiques au C.H.U. de Grenoble, *via* l'équipe du Professeur Christophe Pison du service « Hospitalisation Sommeil et Respiration - Insuffisance Respiratoire Chronique - Transplantation pulmonaire ».

Les prélèvements ont tout d'abord été placés dans du milieu de culture MEM contenant 10% de SVF, et 1% de solution d'antibiotique (Pénicilline, Streptomycine, Amphotéricine B, *Sigma*) à 4°C pour le transport jusqu'au laboratoire. Les tissus ont ensuite été rapidement séchés et congelés dans l'azote liquide, pour être ensuite conservés à -80°C.

V) Expression des protéines recombinantes

Pour éviter le phénomène de variations clonales qui peut altérer la synthèse, la maturation ou le trafic des protéines recombinantes stablement transfectées, nous avons comparé l'expression des protéines recombinantes transfectées transitoirement ou stablement. Ces deux types de transfections ont été réalisés dans deux lignées cellulaires différentes, les BHK-21 et les COS-7, dans le but de s'affranchir des effets propres à l'expression de protéines dans un système hétérologue.

A) Transfections stables

1) Transfections stables au phosphate de calcium

Toutes les transfections stables ont été réalisées dans les cellules BHK-21. Pour transfecter des cellules à 70% de confluence en boîte de 6 cm, 15 µg du plasmide comportant l'ADNc de la protéine d'intérêt étaient mélangés avec 450 µl d'eau stérile, 50 µl de CaCl₂ 2,5 M et 500 µl de BES 2×.

Pour permettre la complexation du plasmide avec le Ca²⁺ et le BES, le mélange était incubé au moins 20 min à température ambiante avant d'être ajouté aux cellules en culture. Ce procédé étant très toxique pour les cellules, nous remplaçons le milieu de transfection par le milieu de culture normal au bout de 4h pour minimiser son effet.

2) Stabilisation des cellules transfectées : sélection par résistance aux antibiotiques

48 h après transfection, les cellules étaient incubées dans du milieu de culture contenant l'agent de sélection dont le gène de résistance était porté par le plasmide d'expression de notre protéine d'intérêt. Ces agents sont le methotrexate (500 μ M) pour les plasmides pNUT et le G418 (0,4 mg/ml) pour les plasmides pCDNA3.1, pEGFP, pEYFP et pECFP.

À l'issue d'une période de sélection de 15 jours, seules les cellules ayant intégrées le plasmide se développaient.

La concentration en agent de sélection utilisée a été déterminée au préalable en testant une gamme de concentrations sur des cellules non transfectées. La concentration retenue est la concentration la plus faible permettant d'obtenir une mortalité de 100% des cellules après 5 jours de culture en présence de l'agent de sélection.

Les niveaux d'expression en protéines recombinantes ont été évalués par immunodétection (western-blot) et immunofluorescence. Afin d'enrichir les lignées stables obtenues avec les constructions exprimant les protéines taguées GFP, les cellules ont été triées par cytométrie en flux, dont le principe est expliqué ci-dessous.

3) 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 laser qui excite la molécule fluorescente. La spécificité de l'excitation lumineuse est déterminée par la longueur d'onde du laser, choisie parmi les raies disponibles.

Un tri, séparation physique des cellules, peut alors être réalisé. Ce 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 concerne notre étude, cette méthode a été utilisée pour isoler les cellules stablement transfectées par des protéines fusionnées à la protéine fluorescente GFP.

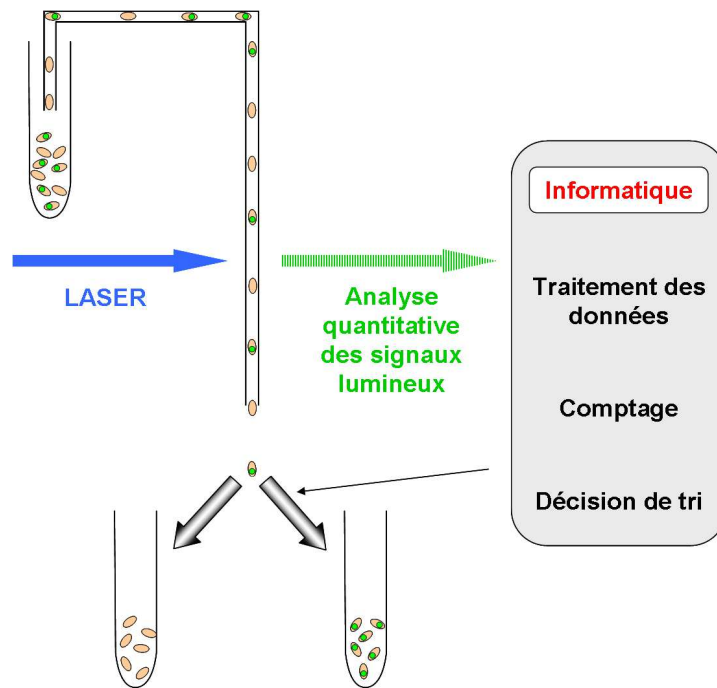


Figure M4 : Principe d'un cytomètre en flux.

b) Protocole de l'analyse cytométrique

Les cellules à analyser, une fois à confluence, étaient trypsinées et récoltées dans un tube de 15mL. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 1 ml 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 M4.

B) Transfections transitoires

Pour les transfections transitoires, les cellules COS-7 et COS-1 ont été utilisées. La transfection transitoire était réalisée à l'aide du kit FuGENE 6. Pour ce faire, en boîte de 6 cm, 6 μ l de FuGENE 6 mélangés avec 194 μ l de milieu de culture sans sérum étaient incubés 5 min à température ambiante, puis 2 μ g de plasmide pcDNA3.1 codant l'ADNc de la protéine d'intérêt étaient ajoutés. L'ensemble était incubé 40 min à température ambiante avant d'être ajouté sur les cellules en culture. Après 24 h, les cellules étaient partagées en deux lots pour être utilisées par la suite (après 48 h), pour les expériences d'une part d'immunofluorescence et d'autre part d'immunodétection (Western Blot).

VI) Mesure de la résistance transépithéliale

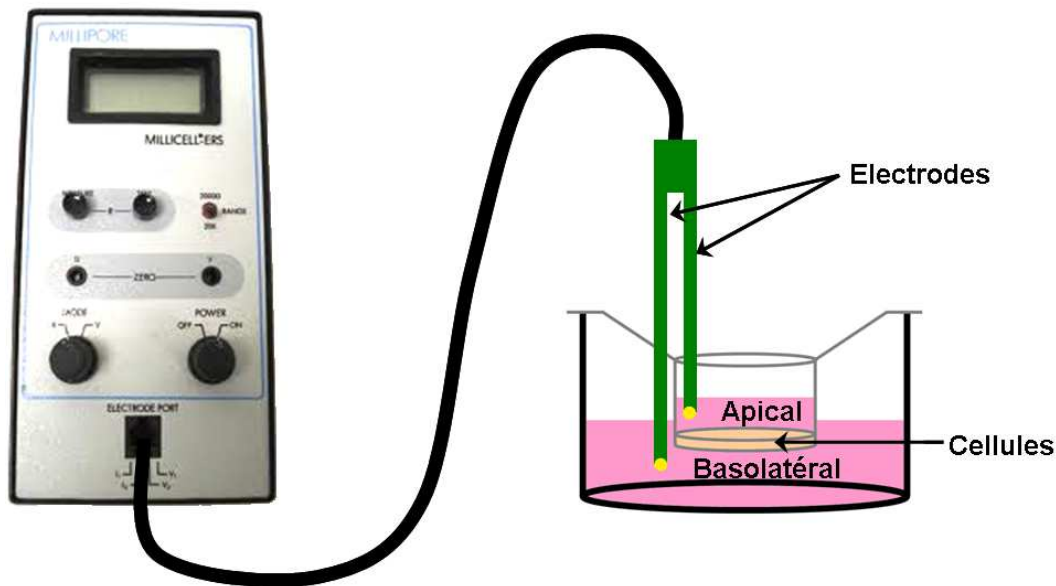


Figure M5 : Système de mesure du TER.

La résistance est mesurée grâce à un ohmmètre relié à deux électrodes, la première dans le apical et la deuxième dans le compartiment basolatéral.

La mesure de la résistance transépithéliale (TER) permet d'évaluer l'installation et le développement des jonctions entre les cellules épithéliales ou endothéliales d'une monocouche de cellules et était réalisée avec l'appareil Millicell®-ERS.

Ces mesures étaient effectuées sur cellules ayant poussé sur des filtres de polycarbonates « Transwell » (taille des pores : 0,4 μm). Pour chaque condition, 3 puits étaient utilisés et 2 mesures par puits étaient effectuées. Le volume de milieu était de 300 μl en apicale et 900 μl en basal. La valeur était lue contre un blanc correspondant à un filtre sans cellule et ramenée en Ω/cm^2 . Le système de mesure est illustré sur la figure M5.

VII) Mesure de l'invasion bactérienne

Pour évaluer l'invasion bactérienne d'une monocouche de cellules épithéliales, ces dernières étaient cultivées sur « Transwell » de la même manière que pour les mesures de résistance transépithéliale. Ces cellules étaient infectées par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* exprimant constitutivement la GFP de manière à avoir un MOI (Multiplicity Of Infection) de 10, c'est-à-dire 10 fois plus de bactéries que de cellules. Après une incubation de 4 h à 37°C, les cellules étaient lavées 20 min avec du milieu de culture MEM + 10% SVF contenant de la gentamycine (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) afin de tuer les bactéries n'ayant pas pénétré les

cellules. Le milieu contenant la gentamycine était ensuite retiré, et les cellules étaient lavées au PBS avant d'être fixées avec de la formaline 10% pendant 20 min. Les filtres étaient alors découpés, montés sur lamelle, et visualisés au microscope à épifluorescence. Le niveau d'invasion bactérienne était quantifié en comptant le nombre de bactéries présentes dans les cellules. Cette valeur était corrigée en faisant le ratio « nombre de bactéries/nombre de noyaux ».

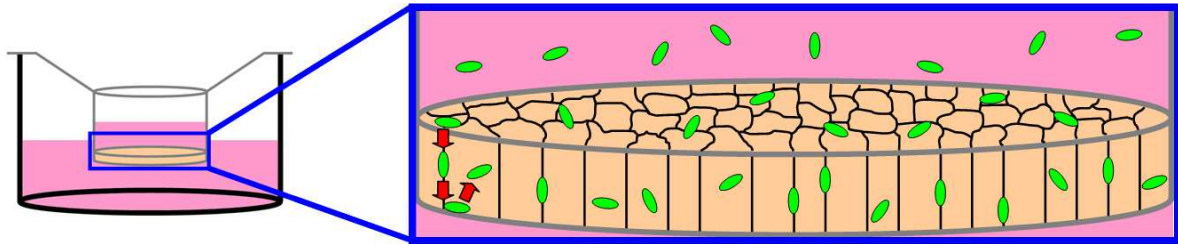


Figure M6 : Schéma de l'infection de la monocouche de cellules épithéliales sur Transwell par *P. aeruginosa* exprimant la GFP.

Les bactéries passent entre les cellules épithéliales formant la monocouche pour rejoindre le pôle basal. Zone par laquelle elles entrent dans la cellule pour l'infecter. Les cellules épithéliales sont en beige, les bactéries sont en vert.

VIII) Test de blessure

Le test dit « de blessure » permet d'évaluer la migration cellulaire. Il consiste à créer une blessure artificielle sur une culture cellulaire et observer la vitesse de comblement de cette blessure grâce à la migration des cellules (Fig. M7).

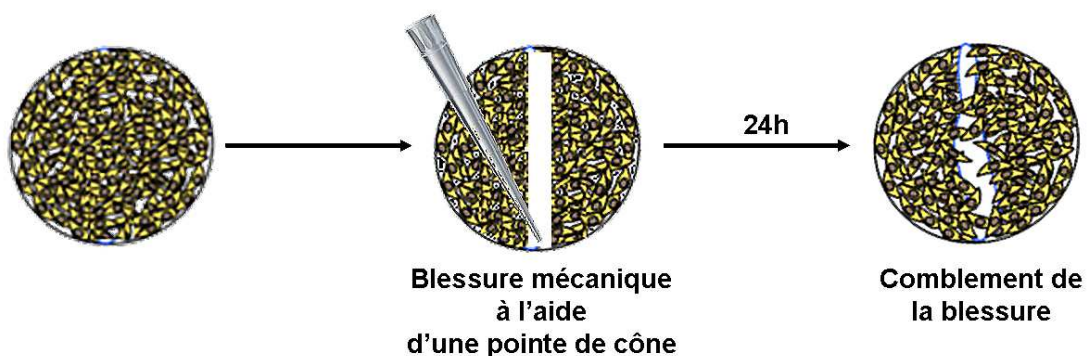


Figure M7 : Principe du test de blessure.

Les cellules épithéliales étaient cultivées sur boîte de 6 cm jusqu'à confluence. Une blessure était alors créée à l'aide d'une pointe de cône stérile. La blessure était photographiée avec un microscope inversé (Axiovert 200M, Zeiss, France) équipé d'une caméra (AxioCam MRm, Zeiss, France). Les cellules étaient remises en culture pendant 24h, et une deuxième

photographie était acquise. La mesure de fermeture de la blessure était réalisée à l'aide du logiciel Image J.

IX) Transfection d'ARN interférents

La technique des ARN interférents permet de réduire la synthèse d'une protéine cible. En effet, un ARN interférent, avec une séquence nucléotidique pouvant s'apparier avec une région précise de l'ARNm de la protéine cible, est introduit dans la cellule. Il va alors activer le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) et le conduire jusqu'à l'ARNm cible, qui va être dégradé (Fig. M8).

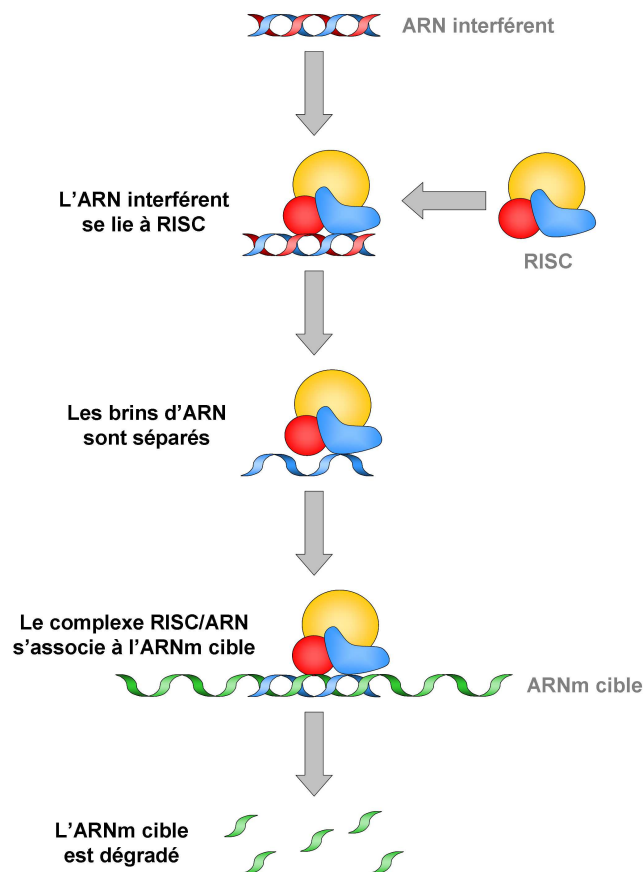


Figure M8 : Principe de l'interférence par ARN.

Les transfections étaient réalisées sur des cellules épithéliales confluentes afin de voir l'effet de la diminution d'expression de protéines sur la résistance transépithéliale des cellules grâce à l'agent de transfection HiPerfect. Pour chaque Transwell, 80 ng d'ARN interférents étaient dilués dans 55 µl de milieu de culture sans sérum ni antibiotiques, puis 6,3 µl de HiPerfect étaient ajoutés au mélange, qui était alors agité 1 sec au vortex. Le complexe était

incubé 10 min à TA puis ajouté sur les cellules (15 µl en apical et 45 µl en basal). Les cellules étaient alors incubées 72 h avec le complexe HiPerfect-ARN.

Les transfections étaient aussi réalisées sur les cellules BHK-21 à 50% de confluence afin de voir l'effet de la diminution d'expression de protéines sur la dégradation de la protéine CFTR grâce à l'agent de transfection HiPerfect. Pour chaque boîte de 6 cm, 130 ng d'ARN interférents étaient dilués dans 92 µl de milieu de culture sans sérum ni antibiotiques, puis 10,5 µl de HiPerfect étaient ajoutés au mélange, qui était alors agité 1 sec au vortex. Le complexe était incubé 10 min à TA puis ajouté sur les cellules (se trouvant dans 2 ml de milieu de culture). Les cellules étaient alors incubées 72 h avec le complexe HiPerfect-ARN.

X) Evaluation du niveau d'expression des ARNm

A) Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée avec le kit de Promega. Les boîtes de cellules, préalablement placées sur la glace, étaient lavées avec du PBS. Puis les cellules étaient lysées par ajout de 900 µl de la solution dénaturante. Le lysat était transvasé dans un tube eppendorf froid. 90 µl d'acétate de sodium étaient ajoutés au tube puis mélangés. 900 µl de phénol-chloroforme étaient ajoutés et le tube et agités vigoureusement. Les tubes étaient placés dans la glace pendant 15 min. La solution était centrifugée à 10000 g pendant 20 min à 4°C. La phase aqueuse qui contient les ARN était récupérée et un volume égal d'isopropanol était ajouté au mélange. Une incubation à -20°C pendant 5 min permettait de faire précipiter les ARN. Une centrifugation de 10 min à 10000 g à 4°C permettait de culotter l'ARN qui était lavé avec 1 ml d'éthanol 70% froid sans le décoller. Après une nouvelle centrifugation à 10000 g pendant 10 min à 4°C, l'éthanol était aspiré et le culot d'ARN, une fois séché, était repris dans 50 µl d'eau DEPC 0,05%. La concentration était déterminée par lecture au nanodrop de la densité optique à 260nm.

B) Transcription inverse des ARNm

La transcription inverse, réalisée grâce au kit « GoScript™ Reverse Transcription System », se faisait dans un volume final de 20 µl avec 1 µg d'ARN totaux à 4°C.

Le mélange réactionnel était réalisé dans un eppendorf stérile de la manière suivante :

- 0,5 µg d'amorces hexamères aléatoires
- 1 µg d'ARNm

- qsp 11,5 µl H₂O

Le mélange est chauffé à 70°C pendant 5 min puis remis rapidement dans la glace pendant 5 min. Les composants suivants du kit étaient alors ajoutés :

- 1 µl dNTP 10 mM
- 4µl 5X Buffer
- 2,4 µl MgCl₂ 25mM
- 1 µl reverse transcriptase

Le mélange était incubé à 25°C pendant 5 min, puis à 42°C pendant 1 h. La réaction était arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15min.

C) PCR quantitative

Les expériences de PCR quantitatives ont été réalisées en plusieurs étapes sur plaques 96 puits grâce au kit « GoTaq qPCR Master Mix ».

1) Obtention des gammes étalons

Pour obtenir nos gammes d'étalonnages, une PCR avec le kit « GoTaq qPCR Master Mix » était réalisée pour chaque jeu d'amorce selon les recommandations du fabricant. Le produit PCR était alors déposé sur gel d'agarose puis extrait à l'aide du kit GeneClean Turbo, puis dosé par spectrométrie à 260 nm. Grâce à cette concentration et à la longueur du fragment amplifié, nous avons pu calculer le nombre de copie d'ADNc par microlitre. Une dilution en cascade était alors réalisée pour pouvoir servir de gamme par la suite.

Tableau M3 : Amorces utilisées pour les expériences de PCR quantitatives.

Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens
ZO-1	GAACGAGGCATCATCCCTAA	CCAGCTTCTCGAAGAACCAC
Occ	TCAAACCGAATCATTATGCA	AGATGGCAATGCACATCACA
E-cad	TGGACAGGGAGGATTTTGAG	ACCTGAGGCTTTGGATTCTT
β-cat	AAAGCGGCTGTTAGTCACTG	CGAGTCATTGCATACTGTCC
CFTR	AAAAGGCCAGCGTTGTCTCC	AAACATCGCCGAAGGGCATT
Gα ₁₂	ATGGTCTCCTCCAGCGAGTA	CTTGATGCTCACGGTCTTCA
Gα ₁₃	GGAGATCGACAAATGCCTGT	CAACCAGCACCTCATACT

2) Détermination des niveaux d'expression des ARNm

Une PCR était réalisée avec plusieurs points de la gamme réalisée précédemment ainsi que les échantillons d'intérêt. Une fois la PCR terminée, la valeur de CT était donnée pour

chaque échantillon. La valeur de CT représente le nombre de cycle à partir duquel le nombre d'amplicons dépasse un certain seuil fixé. Grâce au nombre de copies d'ADNc des points de la gamme et de leur CT respectives, il nous a été possible de réaliser une courbe d'étalonnage, grâce à laquelle nous avons pu déterminer le nombre de copie d'ADNc de chaque échantillon.

Le nombre de copie d'ADNc du gène d'intérêt était ensuite rapporté au nombre de copie d'ADNc d'un gène de ménage (la GAPDH dont l'expression ne varie pas) pour chaque échantillon.

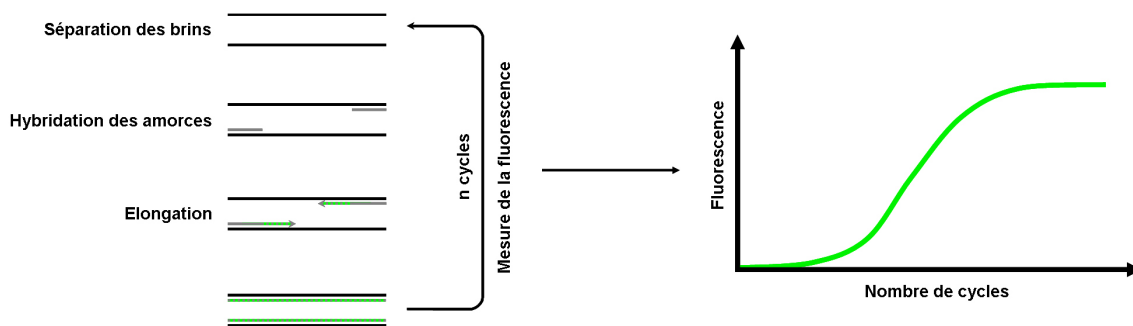


Figure M9 : Principe de la PCR quantitative.

XI) Imagerie

A) Immunolocalisation cellulaire

1) 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 (Fig. M10). 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).

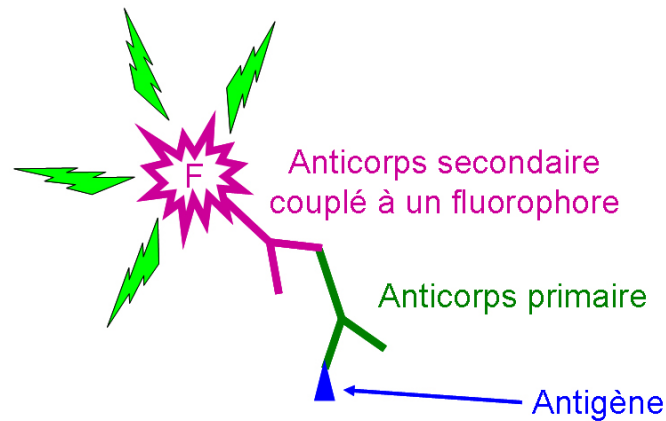


Figure M10 : Principe de l'immunofluorescence indirecte.

2) Protocole d'immunomarquage

Pour les expériences d'immunolocalisation, les cellules étaient cultivées sur des lamelles de 12 mm de diamètre. Les cellules étaient fixées pendant 20 min à TA par la formaline 10%. Après fixation, les cellules étaient perméabilisées avec 0,2% de Triton X-100 pendant 5 min et la lamelle était saturée avec le tampon de blocage (0,5% BSA dans du PBS contenant 0,1 mM Ca^{2+} et 2 mM Mg^{2+}). L'incubation successive avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt et l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 488 ou anti-IgG de lapin couplé au TRITC nous a permis de détecter au niveau cellulaire le complexe anticorps-antigène fluorescent par l'utilisation d'un microscope à fluorescence, après montage lamelle/lame en présence de milieu de montage.

3) Microscopie à épifluorescence

L'observation de la fluorescence a été rendue possible grâce à l'utilisation du microscope inversé à fluorescence (Axiovert 200M, Zeiss, France). Ce microscope est équipé d'un jeu de filtres permettant la détection du DAPI ($\lambda_{\text{ex}}= 359\text{nm}$ et $\lambda_{\text{em}}= 461\text{nm}$), 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'images avec l'objectif à immersion 63x (X 63/1,35 Zeiss, France). Les images étaient, par la suite, analysées avec le logiciel AxioVision 4.2 (Zeiss, France).

4) 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 était un 63x à immersion.

La sélection de la zone d'intérêt et la mise au point d'approche étaient réalisées en mode épifluorescence. On basculait par la suite en mode confocal pour la mise au point fine qui était réalisée à partir du module de commande du système confocal TCS SP2. Le réglage de la longueur d'onde et de la puissance de la raie laser d'excitation (HeNe/ArKr), le choix du filtre dichroïque et le réglage de la fenêtre d'acquisition et du gain du photomultiplicateur étaient réalisés pour chaque fluorochrome. Une fois ses réglages établis, ils n'étaient plus modifiés au cours de la séance d'acquisition et étaient appliqués à toutes les lignées cellulaires dans un souci de normalisation.

Les prises de vues étaient réalisées par 3 à 5 balayages unidirectionnels successifs à la vitesse de 400 Hz qui étaient moyennés afin de diminuer le bruit de fond électronique. Le mode séquentiel était employé lorsqu'il y avait plusieurs fluorochromes.

L'acquisition de la fluorescence et la reconstitution des images ont été données par le logiciel contrôlant le système : Leica confocal software (*Leica*, France).

B) Immunohistochimie

L'immunohistochimie (IHC) est réalisée sur tissus fixés montés sur lame et repose sur la détection du peptide ou de la protéine qui va être reconnue par un anticorps spécifique. Cet anticorps est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une enzyme (la peroxidase dans notre cas).

La révélation se fait alors à l'aide du substrat de l'enzyme (diaminobenzidine pour la peroxidase).

Nous avons utilisé des anticorps primaire, anti-G α_{12} et anti-G α_{13} humain développés chez le lapin. L'anticorps secondaire utilisé était l'anticorps biotinylé anti-lapin, qui se fixe sur l'anticorps primaire. A ce complexe, nous avons rajouté les protéines : avidine, biotine et peroxidase qui vont permettre à la fois une amplification du signal et une détection des sites

d'expression et ce, après addition du substrat de l'enzyme peroxydase, le DiAminoBenzidine (DAB). Ce substrat chromogène va traduire une réaction positive par une coloration marron aux sites d'expression de la protéine recherchée. Le principe est illustré figure M11.

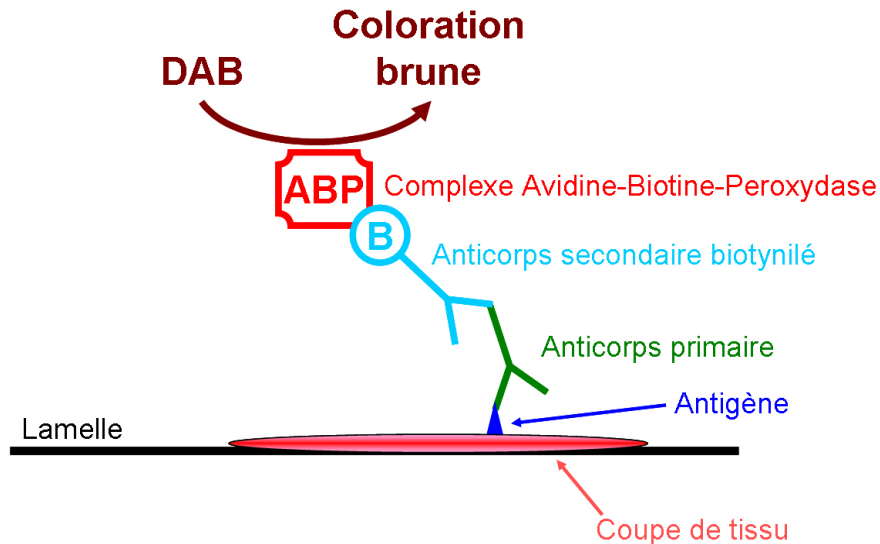


Figure M11 : Principe de l'immunohistochimie.

Brièvement, à partir des coupes de paraffine, nous réalisons une étape de déparaffination qui consiste en une succession de bains. Le premier est un bain de xylène, suivi d'alcool 100%, d'alcool 90%, d'alcool 70% et enfin d'alcool 50%.

Les coupes sont ensuite placées dans un mélange de 3,5 ml d'H₂O₂ 30% complété à 100 ml avec du méthanol pendant 30 minutes, étape nécessaire pour inhiber les peroxydases endogènes présentes dans le tissu.

Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués pendant 1 heure avec du sérum normal de chèvre (NGS) : 120 µl de NGS complétés à 10 ml avec du PBS 1X (Phosphate Buffer Solution).

L'anticorps primaire : anti-Gα₁₂ ou anti-Gα₁₃ humain dilué au 1/100 dans du PBS 1X est alors rajouté et reste au contact des sections tissulaires pendant toute une nuit à 4°C.

Le lendemain, 2 rinçages au PBS 1X sont effectués avant de rajouter pendant 2 heures l'anticorps biotinylé dilué au 1/250. Deux lavages au PBS 1X sont effectués et le tissu est incubé avec le complexe avidine-biotine-peroxydase pendant deux heures.

Deux derniers lavages au PBS 1X sont réalisés avant la révélation de la réaction finale suite à l'addition substrat DAB.

Enfin, nous faisons un contre marquage pendant 1 minute à l'hématoxyline de Carrazzi, qui colore les noyaux en bleu.

Finalement, nous procédons à l'étape de déshydratation qui consiste à refaire plusieurs bains croissants d'alcool (50%, 70%, 90%, 100%) puis de xylène avant de les monter avec le milieu de montage pour microscopie.

C) Proximity Ligation Assay (PLA)

La méthode de « Proximity Ligation Assay » est une méthode originale réalisée avec le kit Duolink® (Olink) permettant la visualisation *in cellulo* d'interaction protéique grâce à une réaction de polymérisation couplée à un marqueur fluorescent (Fig. M12). Chaque point rouge dans la cellule représente une interaction entre nos deux protéines d'intérêt.

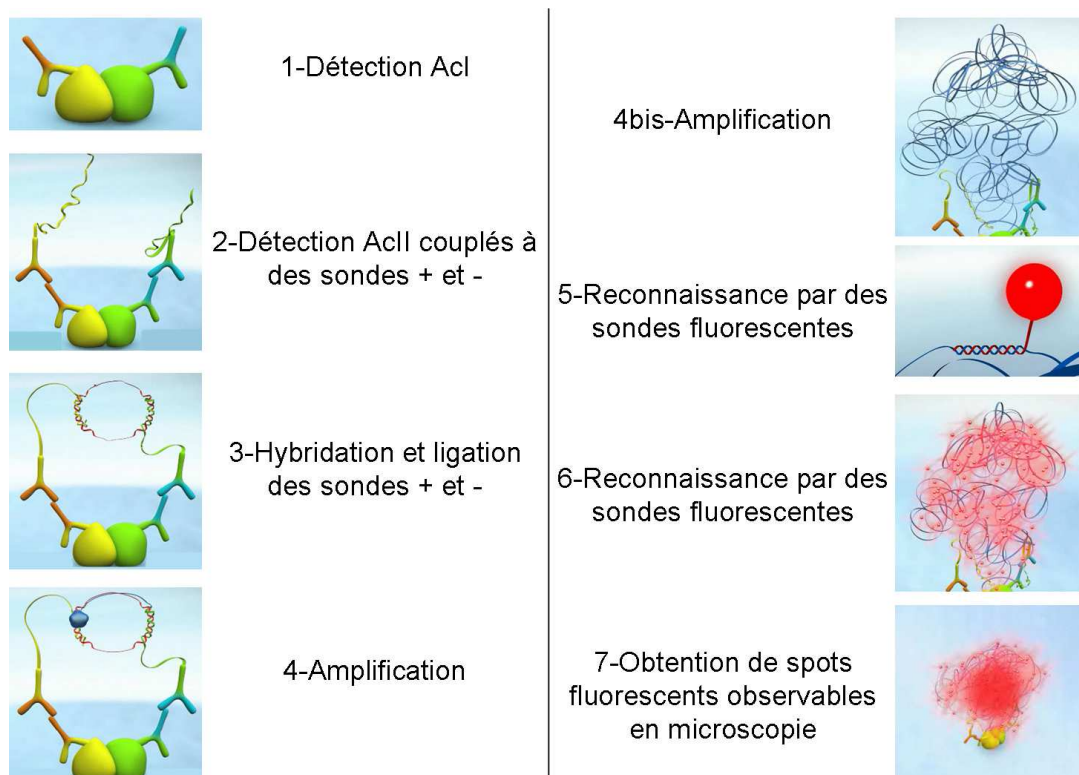


Figure M12 : Principe du « proximity ligation assay ».

Les cellules sont cultivées sur lamelles de verre jusqu'à atteindre une confluence comprise entre 10 et 20% pour les cellules non-épithéliales, et 100% pour les cellules épithéliales.

Les lamelles étaient lavées dans du tampon PBS+Ca²⁺+Mg²⁺ puis les cellules sont fixées pendant 20 min dans de la formaline 10%. Après 3 lavages dans du tampon

PBS+Ca²⁺+Mg²⁺, les cellules étaient perméabilisées dans une solution de Triton X-100 (0,2% dans du PBS+Ca²⁺+Mg²⁺) durant 5 min. Les lamelles étaient alors lavées 3 fois dans du tampon PBS+Ca²⁺+Mg²⁺ puis bloquées 1 h dans le tampon de blocage (0,5% de BSA dans du PBS). Elles étaient ensuite incubées 1 h avec les anticorps primaires dilués au 1/200^{ème} dans du tampon de blocage, lavées 3 fois 5 min dans 100 ml de PBS, puis incubées avec les anticorps secondaires PLA dilués au 1/5^{ème} dans du tampon de blocage (la solution d'anticorps secondaires doit être préparée 20 minutes à l'avance) pendant 1 h à 37°C en chambre humide. Deux lavages de 5 min étaient alors effectués dans 100 ml de PBS puis les cellules étaient incubées 30 min à 37°C avec la solution de ligation en chambre humide. Les lamelles étaient lavées 2 fois 2 min dans 100 ml de PBS puis incubées 100 min à 37°C avec la solution d'amplification en chambre humide. Pour finir, les lamelles étaient lavées 2 fois 10 min dans 100 ml de solution B 1x (5,84 g de NaCl, 4,24 g de Tris-base et 26g de Tris-HCl dans 1L d'eau, pH à 7,5), 1 min dans 100 ml de solution B 0,01X, séchées et montées avec le milieu de montage additionné de Hoechst (0,001%) pour microscopie.

XII) Techniques biochimiques

A) Méthode de perméabilisation cellulaire et blocage par anticorps

Les cellules BHK-21 exprimant de manière stable la protéine CFTR-F508del ont été perméabilisées dans le tampon CSK (cytoskeletal) pH 6,8 (0,3 M sucrose, 0,1 M KCl, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM sodium-free EDTA, 10 mM PIPES) contenant 50 µg/ml de digitonine (Cavallo *et al.*, 1999). Brièvement, les cellules étaient d'abord lavées deux fois avec le tampon CSK à TA, puis incubées pendant 10min avec le tampon CSK contenant de la digitonine. Les cellules étaient ensuite rincées avec le tampon CSK et incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant le temps du traitement.

Ce traitement consistait à incuber les cellules perméabilisées avec les anticorps anti-Gα₁₂ ou anti-Gα₁₃ (0,5 µg/µl) afin de bloquer leur activité.

B) Extraction protéique

A confluence, et après avoir subi un traitement lorsque ceci était nécessaire, les cellules transfectées de manière stable ou transitoire étaient placées à 4°C et rincées deux fois avec du PBS froid. Les cellules étaient alors resuspendues grâce à un grattoir et récupérées

dans des tubes Eppendorf froids. Après culottage des cellules 2 min à 2500g et à 4°C, l'extraction protéique était réalisée dans du tampon RIPA pH 8 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1% et déoxycholate de sodium 0,5%) contenant des inhibiteurs de protéases (2 mg/ml de Iodoacétamide, 1 mM de PMSF et 10 µg/ml du mélange leupeptine et pepstatine) pendant 20 min à 4°C. Les cellules non solubilisées, les débris et les noyaux étaient ensuite culottés par centrifugation (15000 g, 15 min à 4°C). Le surnageant, contenant les protéines, était alors prélevé et dénaturé par ajout de LSB 2× final et par chauffage 5 min à 50°C.

C) Immunoprécipitation

A la fin du traitement, les protéines étaient extraites selon la méthode décrite dans le paragraphe XII.B. Le lysat cellulaire était alors séparé en deux.

- 10% étaient mélangés avec 27µL d'eau et 8µL de LSB 10X pour contrôler l'expression des protéines.

- Les 90% restant étaient utilisés pour l'immunoprécipitation. Cet échantillon était incubé avec 1 µl d'anticorps anti-HA dans 1 ml de RIPA contenant les inhibiteurs de protéases. Ce mélange était incubé à 4°C sous agitation sur la nuit. Après l'ajout de protéines G-sépharose préalablement rincées trois fois avec du RIPA, le mélange était remis sous agitation à 4°C pendant 2h. Le complexe protéines G-Anticorps-protéine était rincé 5 fois avec 1 ml de RIPA. Les protéines étaient ensuite éluées dans 40 µl de LSB 2X contenant 10% de β-mercaptoéthanol pendant 15 min à 37°C.

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

D) Fractionnement subcellulaire

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

1) Centrifugation différentielle

La centrifugation différentielle s'est faite à partir de cellules à confluence dans des boîtes de 15 cm. Toutes les étapes suivantes ont été faites à 4°C. Après un lavage au PBS

froid, les cellules étaient resuspendues dans 5 ml de tampon d'homogénéisation pH 7,4 (10 mM Hepes, 1 mM EDTA et 0,25 M sucrose). Puis, les cellules étaient culottées par centrifugation à 2000 g pendant 5 min. Le culot était resuspendu dans 3 ml de tampon d'homogénéisation contenant les inhibiteurs de protéases (2 mg/ml de iodoacétamide, 1 mM de PMSF et 10 µg/ml du mélange leupeptine et pepstatine), puis les cellules étaient cassées par 20 aller-retour avec l'homogénéisateur de Dounce.

Les cellules non cassées, ainsi que les noyaux, étaient éliminés par centrifugation à 600 g pendant 10 min. Le surnageant était transvasé dans un tube à centrifugation, tandis que la fraction contenant les noyaux (Ny) était resuspendue dans 500 µl de tampon de dégradation (125 mM potassium acétate, 2,5 mM magnésium acétate, 10 mM glucose, 1 mM DTT, 25 mM Hepes, pH 7,2).

Les mitochondries étaient sédimentées par centrifugation à 15000 g pendant 5 min, le culot était resuspendu dans 500 µl du tampon de dégradation (fraction Mit).

Les microsomes et la fraction soluble, contenus dans le surnageant, étaient séparés par ultracentrifugation à 100000 g pendant 1 h à 4°C. Le culot contenait alors les microsomes ou fraction microsomale (Mic). Cette dernière était resuspendue dans le tampon de dégradation.

Le surnageant était quant à lui ultracentrifugé à 300000 g pendant 2 h afin de séparer la fraction ribosomale (Rib), contenue dans le culot, et le cytosol ou fraction cytoplasmique (Cyt) contenu dans le surnageant.

Les différentes fractions étaient congelées à -80°C après prélèvement de 5 µl pour le dosage protéique.

Afin de décaper les microsomes de leurs protéines périphériques, la fraction microsomale enrichie en RE (Mic), obtenue par centrifugation différentielle, était resuspendue dans 200 µl de carbonate de sodium (Na₂CO₃) 0,1 M pH 11,5. Ce composé est un agent chaotropique qui, en détruisant les liaisons électrostatiques, permet le détachement des protéines liées directement ou indirectement au RE. Le mélange était incubé 30 min dans la glace pour décrocher les protéines périphériques. Une centrifugation à 100000 g pendant 1 h à 4°C permettait de culotter la fraction microsomale décapée (Mics), qui était immédiatement resuspendue dans le tampon de dégradation et congelée à -80°C, alors que les protéines associées au RE étaient récupérées dans le surnageant. Ces dernières étaient précipitées par ajout de 20% de TCA puis sédimentées par centrifugation à 16000 g pendant 15 min à 4°C. Le culot était lavé avec de l'acétone et les protéines étaient culottées par une nouvelle centrifugation, puis suspendues dans le tampon de dégradation (fraction Mp).

2) Fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose

Les cellules à confluence étaient d'abord lavées avec du PBS froid puis grattées et culottées par centrifugation (3000 g, 5 min à 4°C). Le culot cellulaire était repris dans un volume de tampon d'homogénéisation (10 mM Hepes, 1 mM EDTA et 0,25 M sucrose, pH 7,4), contenant les inhibiteurs de protéases (2 mg/ml de Iodoacétamide, 1 mM de PMSF et 10 µg/ml du mélange leupeptine et pepstatine), correspondant à 5 fois le volume de cellules. Les cellules étaient cassées par 30 allers-retours avec l'homogénéisateur de Dounce, puis l'homogénat était passé dans une aiguille de diamètre 25G pour permettre une lyse plus importante des cellules.

Après deux passages, l'homogénat cellulaire était centrifugé à 2500 g pendant 5 min à 4°C pour sédimenter les cellules intactes et les noyaux.

Le surnageant était centrifugé à 8000 g pendant 10 min à 4°C pour culotter les mitochondries.

Les culots obtenus lors des centrifugations étaient resuspendus dans 1 ml de tampon d'homogénéisation puis plongés dans l'azote liquide avant d'être congelés à -80°C. Le surnageant obtenu était déposé sur un gradient de sucrose permettant la séparation des différents organites.

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

A la fin de la dernière centrifugation, les fractions à séparer étaient déposées à la surface du gradient puis les tubes étaient délicatement placés dans le rotor SW28. La séparation se faisait à 130000 g pendant 3 h à 4°C.

Après centrifugation, les fractions de 1 ml étaient récoltées de la plus dense à la moins dense grâce à une pompe péristaltique. Les fractions étaient ensuite diluées deux fois dans du tampon d'homogénéisation, puis ultracentrifugées à 100000 g pendant 1 h à 4°C de manière à séparer les organites du sucrose.

Les culots étaient alors resuspendus dans du tampon de dégradation puis congelés à -80°C.

E) 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 (Mic, Mics et Mp), les protéines ont été dénaturées par ajout de LSB10x puis les échantillons ont été transmis pour analyse.

F) Mesure 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 M4.

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

Tableau M4 : Composition du tampon de mesure de l'activité GTPasique.

	Réactifs	Concentration finale	Volume (µl)
Système couplé	KCl (1M)	30 mM	45
	Phospho-énol Pyruvate (200 mM pH 6,6)	4 mM	30
	NADH (400 mM)	0,4 mM	1,5
	Pyruvate Kinase (10 mg/ml)	40 µg/ml	6
	Lactate Déshydrogénase (LDH) (10 mg/ml)	20 µg/ml	3
	MgCl ₂ (1M)	1 mM	1,5
	GTP (100 mM pH 7)	5 mM	75
	Protéine	100 µg	-
	Tampon de dégradation		1000

G) Dosage protéique

La concentration protéique des différents échantillons était déterminée par le dosage colorimétrique D_c protein assay. Le principe est basé sur la méthode de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), la protéine réagit tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin puis un second réactif (réactif de Folin-Ciocalteu) est ajouté. Il est composé d'un mélange de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans de l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique. Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé. Après extraction protéique, 1 µl d'échantillon à doser était ajouté à 25 µl de solution contenant les réactifs A et S (ratio 50:1) dans un puits de plaque 96 puits, puis 200 µl du réactif B étaient ajoutés. Après 15 min d'incubation au noir à TA, l'absorbance étaient lue à 750 nm grâce à un lecteur de microplaque TECAN. Le calcul de la concentration protéique des échantillons se faisait par comparaison à une gamme étalon réalisée avec de la BSA (sérumalbumine bovine).

H) Électrophorèse et immunodétection

Les protéines étaient séparées en condition dénaturante (SDS-PAGE) selon la technique de Laemmli (Laemmli, 1970) sur des gels d'acrylamide à de 7% (pour CFTR) à 12% (pour G α_{12} et G α_{13}). Les protéines étaient séparées pendant 20 min à 60 V puis environ 1h30 à 140 V, en présence de tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM et SDS 0,1%).

Ces protéines étaient par la suite transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm de porosité) durant 1 h 20 à 100 V et à 4°C dans le tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM et méthanol 20%). L'immunodétection était réalisée après saturation des sites non spécifiques au niveau de la membrane de nitrocellulose par du tampon de blocage (PBS, 5% de lait écrémé, 0,1% Tween 20) pendant 1 h sous agitation. L'incubation avec les anticorps primaires (listés dans le tableau M5) était réalisée à 4°C en présence de tampon de blocage sur la nuit. La détection du complexe anticorps-antigène se faisait grâce à un anticorps secondaire anti-souris (ou anti-lapin suivant l'anticorps primaire) couplé à la peroxydase et à une réaction de chimiluminescence avec le kit ECL Western Blotting.

La quantification de l'intensité de la bande est réalisée à l'aide du logiciel Image J puis l'intensité de chaque bande est ramenée en pourcentage par rapport à la quantité de départ.

Tableau M5 : liste des différents anticorps utilisés pour l'étude et de leurs fournisseurs.

Anticorps	Fournisseur
Anti-CFTR L12B4 (épitope: N386-A412)	Chemicon
Anti-CFTR M3A7 (épitope : D1370-T1380)	Chemicon
Anti-CFTR 24.1 (épitope : DTRL en C-ter)	R&D Systems
Anti-HA	Covance
Anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-CNX	StressGen
Anti-BiP	StressGen
Anti-Hsp70	StressGen
Anti-Hsp90	StressGen
Anti-G α ₁₂	Santa Cruz
Anti-G α ₁₃	Santa Cruz
Anti-ZO-1	Invitrogen
Anti-E-cad	Ozyme
Anti-Occ	Sigma
Anti- β -cat	Chemicon

I) Marquage métabolique au soufre 35

1) Présentation

La technique de marquage métabolique au ³⁵S (pulse-chase en terminaison anglo-saxonne) a pour intérêt de suivre *in vivo* le devenir d'une protéine au cours du temps. Cette technique consiste en un marquage des protéines néosynthétisées par incorporation de méthionine et de cystéine marquées au ³⁵S pendant une période déterminée (pulse), puis en un suivi de ces protéines marquées au cours du temps dans un environnement contenant ces mêmes acides aminés froids (chase).

2) Protocole

A environ 90% de confluence, les cellules BHK-21 transfectées de manière stable étaient rincées deux fois avec du PBS contenant 0,1 mM de Ca²⁺ et 2 mM Mg²⁺, puis incubées 40 min dans un milieu DMEM/F-12 ne contenant ni méthionine ni cystéine à 37°C. Celles-ci étaient ensuite incubées à 37°C dans le même milieu supplémenté par 200 μ Ci de méthionine et cystéine marquées au ³⁵S 20 min. Les protéines radiomarquées nouvellement synthétisées durant la période de pulse pouvaient ainsi être suivies au cours du temps. Après deux rinçages

au PBS contenant 0,1 mM de Ca^{2+} et 2 mM Mg^{2+} , les cellules étaient alors incubées pendant une durée variable dans le milieu de culture habituel.

A la fin de la période de chasse, les protéines étaient extraites dans du RIPA. L'anticorps anti-HA était alors ajouté et le mélange était incubé 2 h à 4°C sous agitation. Après ajout de 40 μl de protéines G Sépharose et incubation sous agitation pendant 1 h à 4°C, les protéines immunoprécipitées étaient rincées six fois avec du RIPA froid puis éluées après une incubation de 30 min dans 40 μl de LSB 2 \times contenant 10% de β -mercaptoéthanol à 37°C. Les protéines immunoprécipitées étaient ensuite séparées en condition dénaturante (SDSPAGE) sur des gels d'acrylamide à 7%.

Ces protéines étaient ensuite fixées pendant 30 min dans un tampon contenant 10% d'acide acétique et 40% de méthanol. Après un rinçage de 5 min dans de l'eau, les gels étaient séchés sous vide pendant 75 min à 70°C. Les gels secs étaient par la suite exposés dans une cassette Kodak BioMax contenant un film Kodak pendant 3 à 7 jours à -80°C. Le film était enfin révélé par autoradiographie. Les mesures d'intensité de radioactivité ont été réalisées grâce au Phosphorimager à l'aide du logiciel Quantity One.

XIII) Statistiques

Chacune des expériences présentées dans cette étude a été répétée au minimum trois fois. Pour chacune de ces expériences, nous avons calculé une erreur standard à partir de ces répétitions afin de valider nos résultats.

Résultats

I) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de la protéine CFTR sauvage et mutée

A) Identification d'une voie de dégradation dépendante du GTP

Dans notre laboratoire, De Keukeleire et collaborateurs ont montré dans un système d'expression hétérologue, les cellules BHK-21, que l'effet des inhibiteurs du protéasome sur la dégradation de CFTR-F508del reste modeste. Ces inhibiteurs ne bloquent pas complètement la dégradation et leur effet sur la demi-vie ($T_{1/2}$) de CFTR mutée reste très limité dans le temps (De Keukeleire *et al.*, 2008). En leur présence, la plupart des CFTR immatures disparaissent au bout de 3 h. Ceci a été interprété comme un retard dans le processus de dégradation, plutôt qu'un blocage, et implique que d'autres systèmes indépendants du protéasome participent à la l'élimination de CFTR au niveau du RE (De Keukeleire *et al.*, 2008).

Cependant, aucun des inhibiteurs connus des protéases, utilisés seuls ou en combinaison avec les inhibiteurs du protéasome n'a pu stabiliser la forme réticulaire de la protéine CFTR (Lukacs *et al.*, 1994). Ceci n'est pas dû à une absence d'effet sur le protéasome, puisque la dégradation d'autres protéines improprement repliées au niveau du RE, comme le récepteur T, sont ralenties par ces inhibiteurs (Tortorella *et al.*, 1998).

1) Mise en évidence dans les cellules BHK

Dans un travail publié récemment par notre équipe, De Keukeleire et collaborateurs ont montré que le traitement par l' AlF_4^- , molécule mimant le phosphate γ du GTP et inhibant spécifiquement l'activité GTPasique des protéines G hétérotrimériques (Li, 2003), ou la déplétion en GTP par l'acide mycophénolique (MPA) ralentit la dégradation de la protéine CFTR-F508del (De Keukeleire *et al.*, 2008).

En utilisant un nouveau clone de cellules BHK-21 exprimant de manière stable la protéine CFTR-F508del étiquetée au niveau de sa partie C-terminale par l'étiquette HA (travaux en cours de rédaction), nous avons confirmé que le traitement par l' AlF_4^- (10 μ M) ou par le MPA (50 μ M) en présence de cycloheximide (CHX, 100 μ g/ml), agent bloquant la synthèse protéique au niveau de la sous-unité 60S des ribosomes eucaryotes, ralentit la dégradation de la protéine CFTR mutée (Fig. 1A). La quantification en utilisant le programme Image J montre que le $T_{1/2}$ de la protéine F508del passe d' \sim 30min (CHX seule) à \sim 90min en présence d' AlF_4^- et à plus de 120 min en présence de MPA (Fig. 1B).

Dans une deuxième étape, nous avons voulu savoir si la dégradation de la forme immature de la protéine CFTR sauvage serait aussi sensible à l'AIF₄⁻.

En effet, il est bien établi que cette forme présente un comportement biochimique similaire à celle de la protéine F508del (Zhang *et al.*, 1998). Ces deux formes possèdent un niveau de repliement insuffisant et par conséquent sont retenues dans le RE et dégradées avec la même vitesse (T_{1/2}~30min) (Cheng *et al.*, 1990; Lukacs *et al.*, 1993; Ward & Kopito, 1994).

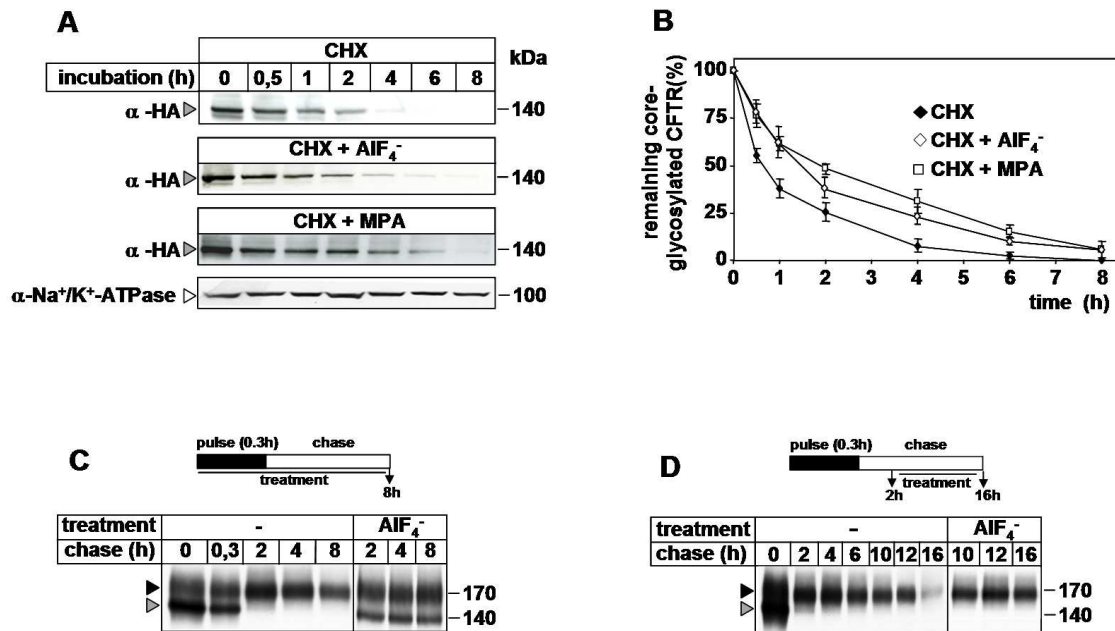


Figure 1 : Effet de l'AIF₄⁻ et du MPA sur la dégradation de CFTR sauvage et mutée F508del.

A : Les cellules BHK exprimant de façon stable CFTR-F508del ont été incubées en présence de CHX (100 µg/ml) en absence et en présence de MPA (50 µM) ou d'AIF₄⁻ (10 µM). 100 µg de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anticorps monoclonal (AM) anti-HA, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL. La Na⁺/K⁺-ATPase sert de contrôle interne.

B : Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à son expression initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne ± S.E (n= 6).

C et D : Les cellules BHK exprimant de façon stable CFTR sauvage ont été incubées durant 20 min dans un milieu contenant de la méthionine (³⁵S-Met) et de la cystéine (³⁵S-Cys) marquées additionné (**C**) ou non (**D**) avec de l'AIF₄⁻ (10 µM). Le marquage a été suivi d'une période de chasse durant laquelle l'AIF₄⁻ a été maintenu (**C**) ou ajouté après 2h de chasse (**D**). Les protéines radiomarquées ont été immunoprécipitées avec l'AM anti-HA, séparées sur gel SDS-PAGE à 7% d'acrylamide et détectées par autoradiographie. La flèche grise correspond à la forme immature et la flèche noire correspond à la forme mature de CFTR.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la technique du marquage métabolique à l'aide de l'isotope radioactif soufre 35 (³⁵S) (Benharouga *et al.*, 2001). Pour cela, nous avons utilisé deux protocoles différents (Fig. 1C et 1D).

Dans le premier protocole, nous avons traité les cellules durant les périodes de marquage métabolique et de chasse (Fig. 1C). Les résultats obtenus montrent, par rapport au contrôle, que l'AIF₄⁻ stabilise la forme immature de la protéine CFTR sauvage (Fig. 1C). Les

résultats confirment aussi que cette molécule n'empêche pas la maturation de la protéine CFTR (Fig. 1C ; (De Keukeleire *et al.*, 2008)). De plus, nous avons observé un effet sur la stabilité de la forme complexe de CFTR. Pour valider ce résultat, nous avons réalisé le deuxième protocole qui consiste à traiter les cellules 2h après le début de la période de chasse, temps nécessaire pour que les 70% de CFTR immatures soient complètement dégradés (Fig. 1D). Ce protocole nous a permis de confirmer que l' AlF_4^- augmente aussi la stabilité de la forme mature de CFTR sauvage.

L'ensemble de ces résultats appuie nos observations publiées récemment (De Keukeleire *et al.*, 2008), et montre que le MPA et l' AlF_4^- ralentissent aussi la dégradation de la forme immature de la protéine CFTR sauvage. Nos résultats montrent également un effet sur la stabilité de la forme mature de CFTR sauvage.

2) Mise en évidence dans les cellules épithéliales bronchiques humaines

L'identification de la voie de dégradation dépendante du GTP a été réalisée dans un système d'expression hétérologue. Pour vérifier la présence de cette voie dans des cellules épithéliales exprimant de manière endogène la protéine CFTR sauvage ou mutée, nous avons reconduit les mêmes expériences en utilisant des lignées cellulaires bronchiques humaines, à confluence, dérivants d'un sujet sain (16HBE14o- = HBE) et d'un sujet mucoviscidose porteur de la mutation F508del/F508del (CFBE41o- = CFBE).

Pour la protéine CFTR mutée, les résultats indiqués sur la figure 2A montrent que dans les cellules CFBE, contrairement aux cellules BHK-21, la protéine F508del est exprimée sous ses deux formes A et B. La forme A correspond à la protéine CFTR nouvellement synthétisée et non glycosylée, alors que la forme B correspond à la forme core-glycosylée dérivant de A. La détection de la forme A a été précédemment décrite dans la littérature, principalement dans les cellules épithéliales (Kälin *et al.*, 1999).

Nos résultats montrent aussi que la forme B est dégradée rapidement ($T_{1/2} \sim 1\text{h}$) par rapport à la forme A (Fig. 2A et 2B). Le traitement par la lactacystine (Lac), inhibiteur spécifique du protéasome, ralentit uniquement la dégradation de la forme B ($T_{1/2} \sim 3\text{h}$), alors que les traitements avec l' AlF_4^- ou le MPA augmentent la stabilité des deux formes avec des $T_{1/2}$ dépassant 8h (Fig. 2A et 2B).

Pour la forme mature de la protéine CFTR, les résultats obtenus avec les cellules HBE confirment ceux observés avec les cellules BHK-21, et montrent que l' AlF_4^- et le MPA

augmentent la stabilité de la forme mature de CFTR sauvage avec des $T_{1/2}$ supérieures à 24h (Fig. 2C et 2D). Cependant, dans ces cellules, il a été très difficile de détecter la forme core-glycosylée pour évaluer l'effet de l' AIF_4^- et du MPA.

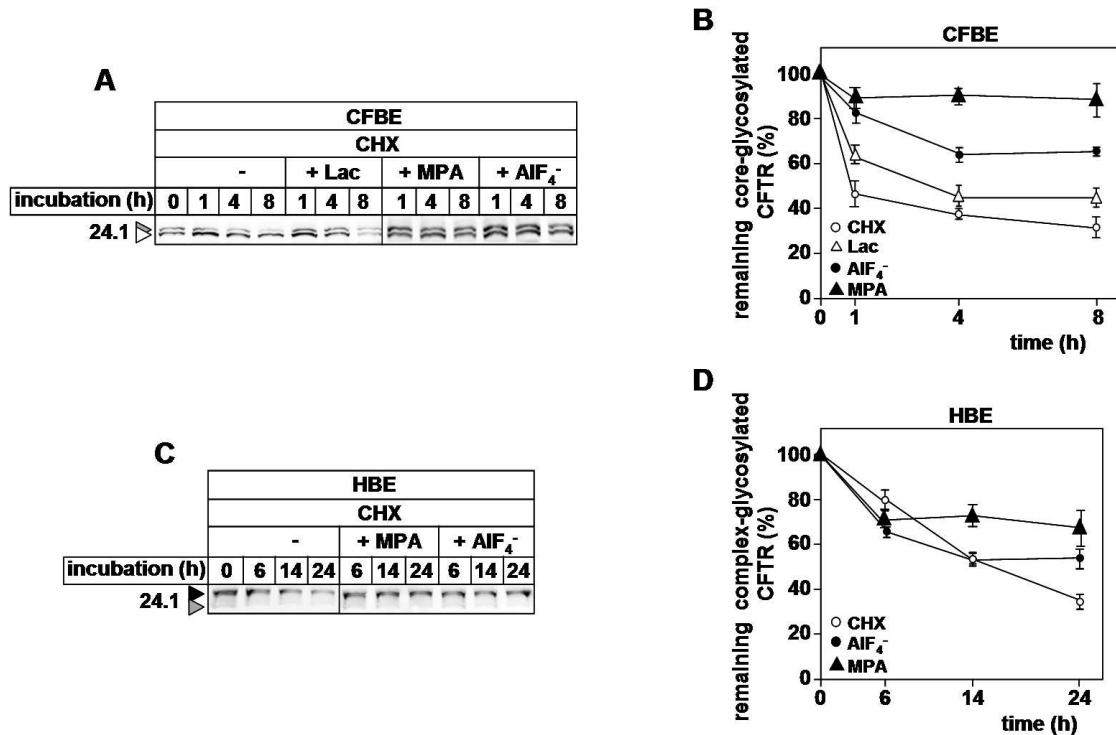


Figure 2 : Effet de l' AIF_4^- et du MPA sur la stabilité de CFTR sauvage et mutée dans les cellules HBE et CFBE.

Les cellules HBE et CFBE exprimant de manière endogène, respectivement, la protéine CFTR sauvage et mutée ont été incubées à différents temps en présence de CHX (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en absence et en présence de MPA (50 μM), d' AIF_4^- (10 μM) ou de lactacystine (Lac ; 10 μM). Les flèches noires, grises et blanches indiquent respectivement les formes C, B et A.

A et C : 100 μg de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'AM anti-CFTR 24.1 et le kit ECL.

B et D : Quantité de CFTR 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 Image J. Moyenne \pm S.E (n= 4).

Ces résultats montrent que la voie de dégradation dépendante du GTP mise en évidence dans les cellules BHK-21 (De Keukeleire *et al.*, 2008) est présente dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, où elle participe à l'élimination de la protéine CFTR sauvage et mutée F508del.

B) La voie de dégradation dépendante du GTP est localisée au niveau du RE

De Keukeleire et collaborateurs avaient démontré que la voie de dégradation dépendante du GTP est associée au RE (De Keukeleire *et al.*, 2008). Cependant, le rôle direct

de la molécule de GTP ainsi que la localisation précise de cette voie au niveau du RE (membranaire, pseudomembranaire ou luminale) n'avaient pas été déterminés.

Pour cela nous avons réalisé deux expériences utilisant une fraction microsomale enrichie en RE (Mic) préparée à partir de cellules BHK-21 exprimant de manière stable la protéine CFTR-F508del (Fig. 3). Cette fraction a été obtenue par gradient discontinu de sucrose et caractérisée enzymatiquement (résultats non montrés et (De Keukeleire *et al.*, 2008)).

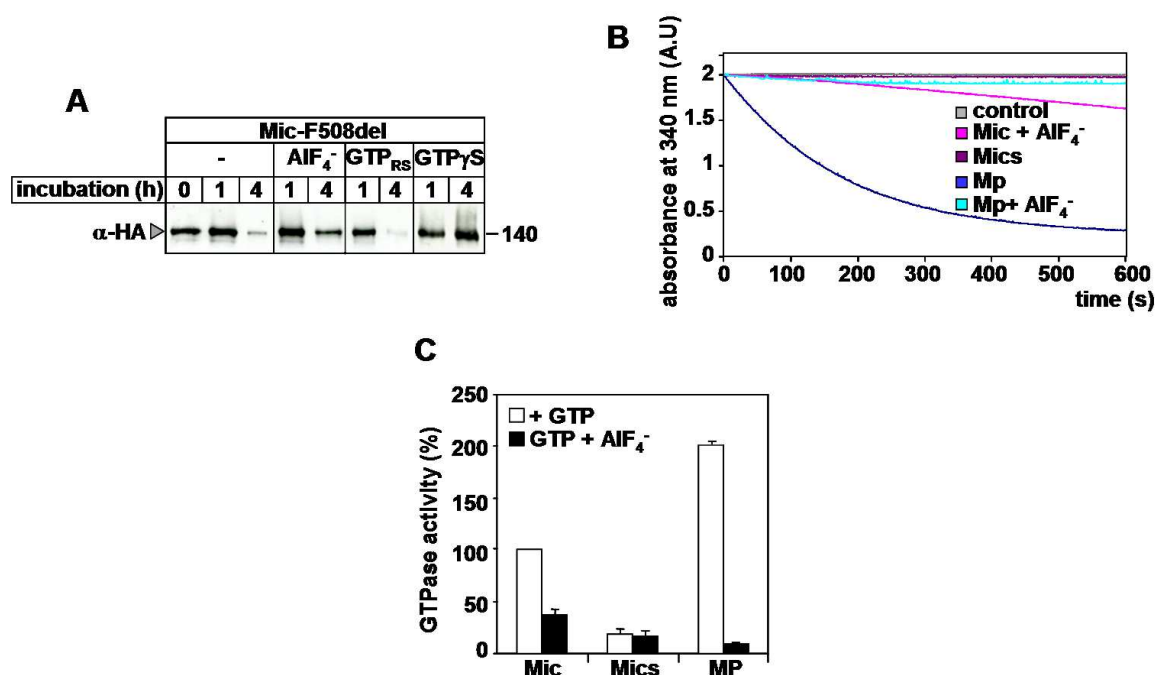


Figure 3 : Rôle du GTP et des protéines périphériques du RE dans la dégradation de CFTR-F508del.

A : Les microsomes enrichis en RE (Mic) ont été préparés à partir des cellules BHK-21 exprimant de façon stable CFTR-F508del-HA. Ces microsomes ont été incubés en présence de CHX (100 µg/ml) et en absence ou en présence d'AIF₄⁻ (10 µM), d'un système de régénération du GTP (GTP_{RS}, 1 unité/ml d'acétate kinase, 15 mM d'acétyl phosphate) ou de GTP non hydrolysable (GTPγS, 100 µM). 100 µg de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL.

B : L'activité GTPasique a été évaluée dans des microsomes enrichis en RE non traités (Mic) ou décapés par Na₂CO₃ (Mics), et dans les protéines périphériques associées à la membrane du RE (Mp).

C : Quantification de l'activité GTPasique représentée en pourcentage par rapport à celle associée à la fraction Mic. Moyenne ± S.E (n =4).

Premièrement, nous avons démontré, de la même manière que pour les traitements réalisés sur cellules entières, qu'un blocage des voies dépendantes du GTP par l'AIF₄⁻ améliore de façon importante la stabilité de CFTR-F508del au niveau de la fraction réticulaire (Mic ; Fig. 3A). L'ajout de GTP non-hydrolysable, le GTPγS (100 µM), confirme l'importance du GTP dans l'élimination de CFTR mutée. *A contrario*, un système de

régénération du GTP (GTP_{RS}) accélère sa dégradation (Fig. 3A), suggérant que le GTP est un facteur limitant de cette voie de dégradation.

L'implication directe du GTP laisse penser qu'une activité GTPasique serait associée à cette voie de dégradation. Pour cela, nous avons évalué cette activité au niveau de la fraction réticulaire (Mic) en absence et en présence d' AlF_4^- (Fig. 3B et 3C). Nos résultats montrent que l'activité de base détectée dans les Mic est inhibé d'~60% par l' AlF_4^- (Fig. 3B et 3C). Cette activité baisse encore plus (~ 85%) dans les Mic traités par Na_2CO_3 , agent permettant de décaper la surface des Mic de leurs protéines périphériques (fraction Mics). En revanche, dans la fraction des protéines périphériques (Mp), l'activité GTPasique a presque doublé et a été abolie en présence d' AlF_4^- (Fig. 3B et 3C).

Ces résultats nous ont permis de montrer que le GTP est une molécule clé dans l'élimination de CFTR mutée et que la voie de dégradation qui lui est associée serait liée directement ou indirectement à la périphérie de la membrane microsomale.

C) Identification et implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de CFTR mutée

Afin de déterminer les acteurs moléculaires de la voie de dégradation dépendante du GTP, les protéines de la fraction Mp ont été analysées par spectrométrie de masse. Cependant, la forte présence de contaminants (par exemple la kératine) a rendu nos résultats non-exploitable. Nous avons par la suite tenté de purifier à partir de la fraction Mp les protéines GTPases sur colonne de GTP. Après plusieurs tentatives infructueuses, nous avons finalement opté pour l'analyse des microsomes entiers (fraction Mic).

Cette analyse nous a permis d'identifier deux GTPases hétérotrimériques de la famille des protéines G12 : $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ (Fig. 4A). Leur présence dans le RE a été confirmée par l'identification d'un grand nombre de protéines résidentes du RE indiquées sur la figure 4A par une étoile (*). La présence de ces protéines, comme la GRP78 (BiP), témoigne aussi de la qualité de nos préparations de microsomes enrichis en RE.

Ces résultats ont constitué le point de départ de l'intérêt de notre groupe à étudier les rôles potentiels des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la biosynthèse, la maturation, le trafic et la stabilité de CFTR sauvage et mutée. D'autant plus que ces protéines, surtout $G\alpha_{12}$, semblent avoir des partenaires protéiques de type chaperonne comme HSP90 (Vaiskunaite *et al.*, 2001), ce qui suggère que cette protéine pourrait être impliquée dans le contrôle du niveau de repliement des protéines nouvellement synthétisées et probablement dans leur dégradation

lorsqu'elles sont mal repliées. A ce jour et à notre connaissance, aucun inhibiteur de ces deux protéines n'est disponible, même s'il existe des molécules capables de bloquer certains de leurs effecteurs (Yamamoto *et al.*, 1993). De plus, il n'est pas exclu que d'autres GTPases hétérotrimériques ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$) soient impliquées dans cette voie de dégradation.

A

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 (HSP 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 (OTTMUSP0000000551) (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)	

B

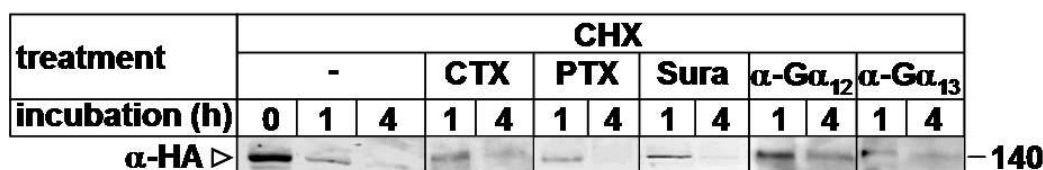


Figure 4 : Implication des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la voie de dégradation dépendante du GTP.

A : Tableau représentant les protéines identifiées avec un grand score par spectrométrie de masse réalisé sur des fractions riche en RE.* indique la présence de protéines caractéristiques de RE. Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ identifiées apparaissent en bleu.

B : Les cellules BHK exprimant de façon stable CFTR-F508del ont été perméabilisées et incubées avec les anticorps anti- $G\alpha_{12}$ ou anti- $G\alpha_{13}$ (0,5 μ g/ μ l), ou traitées avec la toxine cholérique (CTX, 500 ng/ml), la toxine pertussique (PTX, 100 ng/ml), ou la suramine (Sura, 10 μ M). L'ensemble de ces incubations a été réalisé en présence de cycloheximide (CHX, 100 μ g/ml). 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL.

Pour pouvoir discriminer entre certaines GTPase hétérotrimériques potentiellement impliquées dans la voie de dégradation dépendante du GTP, des études de stabilité de la protéine CFTR mutée ont été conduites (Fig. 4B).

Ainsi, les cellules BHK-21 exprimant stablement CFTR-F508del ont été traitées avec la toxine cholérique (CTX, 500 ng/ml) ou la toxine pertussique (PTX, 100 ng/ml) pour inhiber les protéines G hétérotrimériques des familles $G\alpha_s$ (Chang & Bourne, 1989) et $G\alpha_i$ (Burns, 1988), respectivement. Les résultats montrent qu'aucun de ces traitements n'a pu inhiber la dégradation de CFTR-F508del (Fig. 4B), suggérant que ni les membres des $G\alpha_s$, ni les membres des $G\alpha_i$, ne sont impliqués dans la voie de dégradation dépendante du GTP. De même, un traitement à la Suramine (Sura, 10 μ M), molécule qui inhibe l'interaction entre les sous unités α et $\beta\gamma$ (Chung & Kermode, 2005) des protéines G hétérotrimériques, n'a eu aucun effet (Fig. 4B).

Pour les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, nous avons utilisé des anticorps polyclonaux anti- $G\alpha_{12}$ ou anti- $G\alpha_{13}$ dirigés contre leurs parties N-terminales respectives pour inhiber leur activité. Pour cela, les cellules BHK-21 exprimant stablement CFTR-F508del ont été perméabilisées par la digitonine (50 μ g/ml) et incubées avec 0,5 μ g/ μ l d'anticorps anti- $G\alpha_{12}$ ou - $G\alpha_{13}$ en présence de cycloheximide (CHX). Les résultats indiqués sur la figure 4B montrent que ces anticorps ralentissent l'élimination de CFTR-F508del. Cet effet est plus probant en présence d'anti- $G\alpha_{12}$ qu'en présence d'anti- $G\alpha_{13}$ (figure 4B).

L'ensemble de ces résultats montre que la voie de dégradation dépendante du GTP agit principalement *via* la protéine G hétérotrimérique $G\alpha_{12}$. De plus, cet effet semble être indépendant de l'interaction de α et $\beta\gamma$ puisque le traitement à la suramine n'a pas modifié la demi-vie de la protéine CFTR-F508del.

D) Localisation réticulaire des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$

Les protéines hétérotrimériques, sont des protéines solubles synthétisées au niveau du cytoplasme (Rehm & Ploegh, 1997; Fishburn *et al.*, 1999). D'une manière générale, les protéines hétérotrimériques sont souvent décrites comme associées aux RCPG au niveau de la membrane plasmique (Bourne, 1997; Wess, 1997; Hamm, 1998), et leur assemblage avec les sous-unités beta (β) et gamma (γ) pour former le complexe hétérotrimérique nécessaire à la transduction du signal induit par les récepteurs a lieu dans le cytoplasme et/ou le RE (Marrari *et al.*, 2007). Cependant, peu de données sont disponibles sur la localisation et le trafic intracellulaire des protéines G hétérotrimériques, particulièrement pour les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$. De plus, malgré l'identification par spectrométrie de masse des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la fraction microsomale enrichie en RE (Fig. 4A), une possible contamination par d'autres organites n'est pas à exclure.

Pour cela, nous avons conduit des études de localisation intracellulaire sur des cellules exprimant soit de manière endogène, soit de manière exogène, les protéines $G\alpha_{12}$ et/ou $G\alpha_{13}$.

1) Caractérisation des différentes constructions des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$

L'immunolocalisation ainsi que l'immunodétection s'appuient sur l'utilisation d'anticorps capables de reconnaître de manière assez spécifique un antigène présent au niveau de la protéine cible. La nature de l'antigène influence pour beaucoup la qualité des résultats ainsi que leur interprétation. Les anticorps fabriqués contre des antigènes endogènes présentent souvent des réactions croisées avec d'autres protéines, et les résultats obtenus sont souvent très discutés. En revanche, les anticorps dirigés contre des séquences peptidiques d'origine virale, comme le HA, présentent un grand niveau de spécificité et un faible degré de croisement non spécifique avec d'autres séquences peptidiques présentes dans la cellule hôte.

Dans notre étude, nous avons utilisé deux types d'étiquettes. Une séquence peptidique courte (11 acides aminés) d'origine virale (hémagglutinine ; HA) détectée par un anticorps monoclonal anti-HA, et une séquence protéique correspondant à une protéine fluorescente type GFP, YFP ou CFP. Ces dernières sont soit détectées directement par autofluorescence après excitation, soit indirectement par réaction anticorps-antigène.

Ces différentes étiquettes ont aussi été placées sur les constructions correspondantes aux formes hyperactives (temps d'échange $GTP \rightarrow GDP$ plus long ; (Masters *et al.*, 1989)) des protéines $G\alpha_{12}$ ($G\alpha_{12}QL$) et $G\alpha_{13}$ ($G\alpha_{13}QL$).

Les différentes constructions obtenues, décrites précédemment dans la section Matériels et Méthodes, sont représentées dans la figure M2.

En plus des résultats de séquençage, nos différentes constructions ont été caractérisées, après transfection transitoire dans les cellules COS-1, sur un plan biochimique (profil électrophorétique) et sur un plan cellulaire (profil d'expression et de localisation).

Premièrement, la figure 5A et 5B montre que l'ensemble de nos constructions sont exprimées et présentent un profil électrophorétique comparable. En effet, l'immunodétection utilisant les anticorps anti-HA et anti-GFP révèle la présence d'une bande dont le poids moléculaire apparent correspond à celui attendu : ~43 kDa et ~75kDa respectivement (Fig. 5A et 5B).

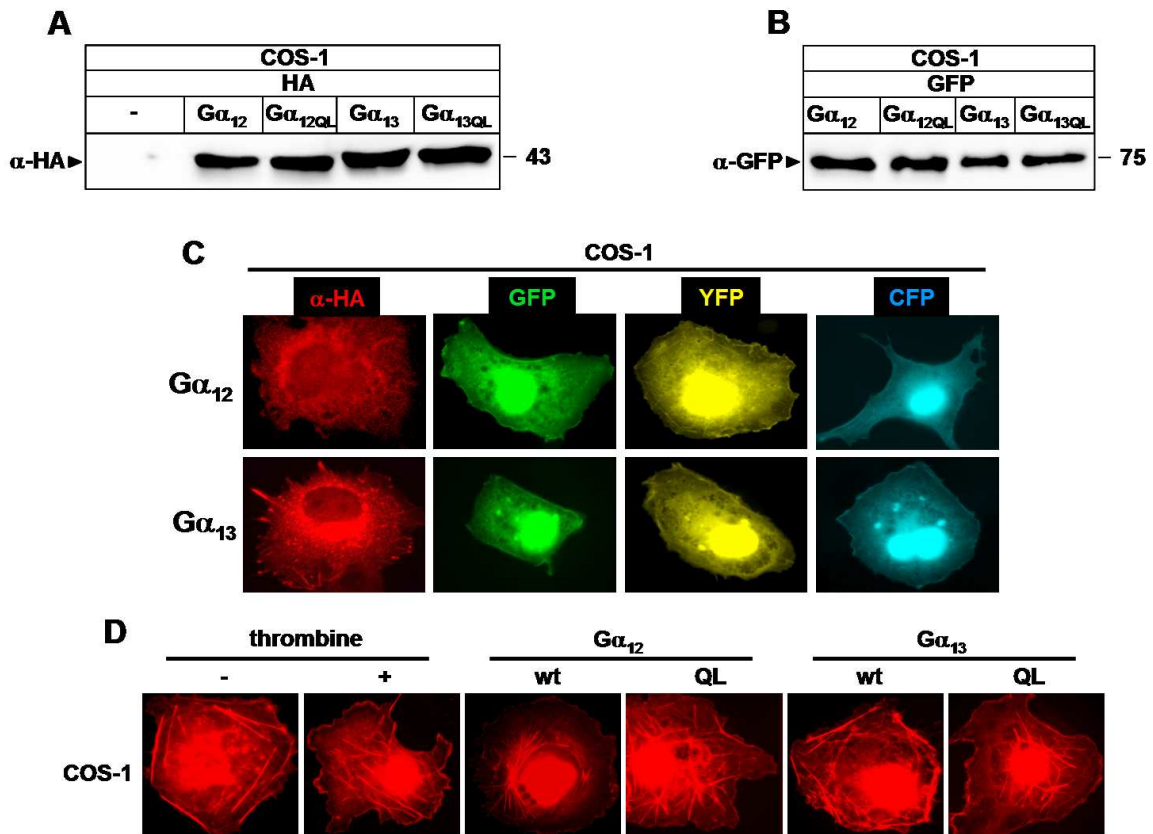


Figure 5 : Expression des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sauvages et mutées.

A : Les cellules COS-1 ont été transfectées transitoirement avec les plasmides codant pour les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ sauvages ou mutées comportant l'étiquette HA. 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 12%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL.

B : Les cellules COS-1 ont été transfectées transitoirement avec les plasmides codant pour les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ sauvages ou mutées comportant l'étiquette GFP. 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 9%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anti-GFP et le kit ECL.

C : Les cellules COS-1, exprimant $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sauvages (étiquetées HA, GFP, YFP et CFP) de manière transitoire, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-HA (pour l'étiquette HA) et directement par autofluorescence des protéines GFP, YFP et CFP (pour les étiquettes GFP, YFP et CFP). La révélation de l'anti-HA a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au TRITC.

D : Les cellules COS-1, exprimant de manière transitoire $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sauvages ou mutées, ont été fixées, perméabilisées et marquées en utilisant la phalloïdine couplée au TRITC afin de visualiser l'actine. Le traitement à la thrombine (1 U/ml) est un contrôle permettant l'induction de fibres de stress. L'ensemble des images (C et D) a été pris au microscope à épifluorescence à l'aide d'un objectif 63 \times à immersion avec un système Zeiss AxioCam MRm et le logiciel AxioVision 4.2.

Par la suite, l'utilisation de l'immunofluorescence indirecte (anti-HA) et directe (émission des molécules GFP, YFP et CFP après excitation) nous a permis d'observer que nos constructions présentent une distribution intracellulaire identique avec une expression très concentrée dans une région périnucléaire, probablement le RE (Fig. 5C). La présence dans le noyau pour les constructions fluorescentes provient d'un clivage entre la protéine $G\alpha_{12/13}$ et le fluorophore associé, qui se concentre dans le noyau. Nous avons aussi observé une présence

au niveau de la membrane plasmique qui suggère l'association de ces protéines avec des récepteurs membranaires.

Par la suite, nous avons validé les constructions correspondant aux formes hyperactives des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$. En effet, il est bien établi que la forme active de $G\alpha_{12}$ ($G\alpha_{12}QL$) et de $G\alpha_{13}$ ($G\alpha_{13}QL$) provoque le stress des fibres d'actine, et donc un changement de l'orientation cellulaire de ces fibres (Meyer *et al.*, 2003; Donato *et al.*, 2009). Pour cela, nous avons utilisé de la phalloïdine couplées à l'agent fluorescent rhodamine (TRITC) pour marquer l'actine des cellules COS-1 transfectées transitoirement avec nos différentes constructions. Comme contrôle, nous avons traité les cellules COS-1 non transfectées avec de la thrombine, molécule connue pour induire un stress d'actine via le récepteur PAR et les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ (Ponimaskin *et al.*, 2000; Ayoub *et al.*, 2010) (Fig. 5D).

Les résultats obtenus confirment que les formes actives sont fonctionnelles. Par rapport aux cellules contrôles (COS-1 non traitées ou exprimant transitoirement $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$), les cellules traitées par la thrombine ou exprimant transitoirement $G\alpha_{12}QL$ ou $G\alpha_{13}QL$ présentent un stress des fibres d'actine très marqué avec une anarchie dans leur orientation cytoplasmique (Fig. 5D).

Ces résultats montrent que les différentes étiquettes (HA, GFP, YFP ou CFP) n'influencent pas le comportement électrophorétique, la distribution cellulaire ou l'activité fonctionnelle.

2) Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont principalement localisées dans le RE

Très peu d'études se sont penchées sur la localisation cellulaire des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$. Il est néanmoins admis qu'elles sont partiellement localisées au niveau des jonctions cellulaires épithéliales (Denker *et al.*, 1996; Dodane & Kachar, 1996; Hamilton & Nathanson, 1997) et plus généralement, comme toutes les autres protéines G hétérotrimériques, au niveau de la membrane plasmique (Spicher *et al.*, 1994). Une localisation au niveau mitochondriale a aussi été suggérée pour $G\alpha_{12}$ (Andreeva *et al.*, 2008).

Pour cela, nous avons utilisé plusieurs types cellulaires pour analyser la localisation des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ par immunofluorescence (COS-7, HEK-29 et IB3-1) et par fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle (BHK-21 et A549).

Les résultats montrent tout d'abord que l'utilisation des anticorps polyclonaux permet de détecter les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ exprimées de manière endogène dans les cellules COS-7, HEK-293 et IB3-1 (Fig. 6A). Dans ces cellules, ces protéines présentent une distribution comparable à celle obtenue dans les cellules COS-1 exprimant de manière transitoire les mêmes protéines couplées aux étiquettes HA, GFP, YFP ou CFP (Fig. 5C et 6A).

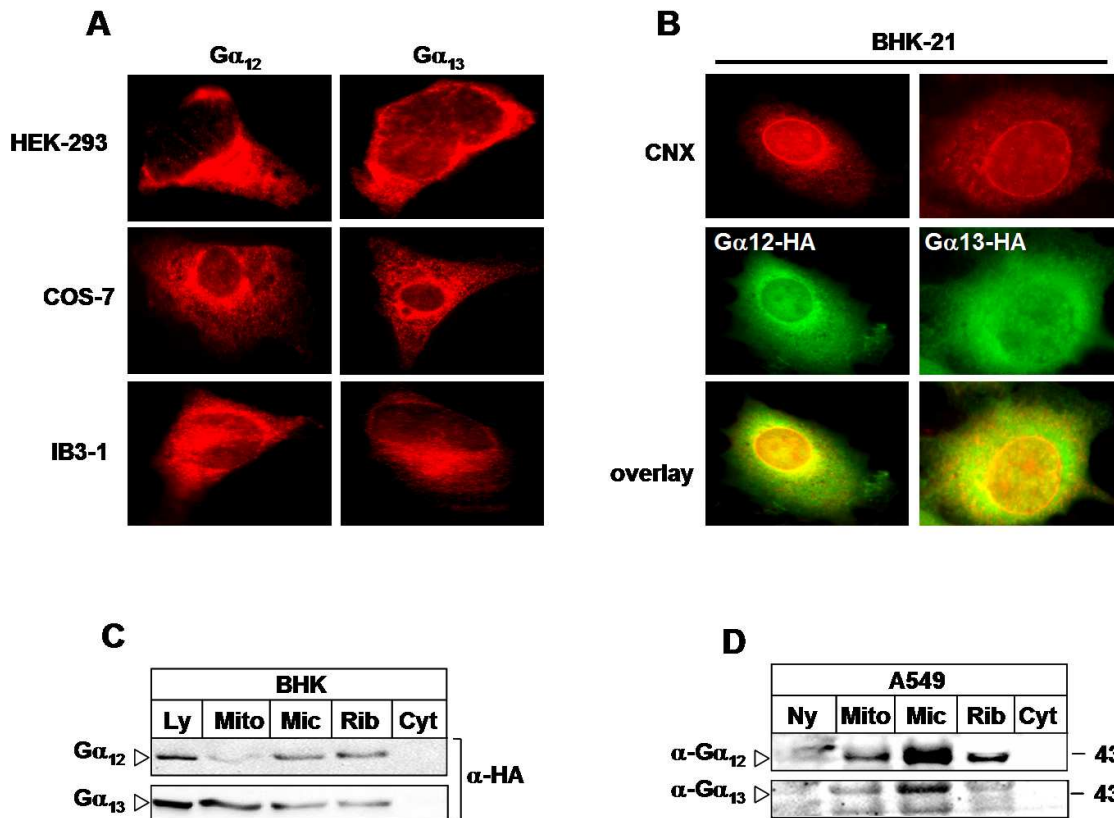


Figure 6 : Localisation des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.

A : Les cellules HEK-293, COS-7 et IB3-1, exprimant $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ de manière endogène, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti- $G\alpha_{12}$ ou l'anti- $G\alpha_{13}$. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé au TRITC.

B : Les cellules BHK, exprimant $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ étiquetées HA de manière stable, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-HA et l'anti-CNX. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa488 (pour le HA) et d'un anticorps anti-lapin couplé au TRITC (pour la CNX). L'ensemble des images (A et B) a été pris au microscope à épifluorescence à l'aide d'un objectif 63× à immersion avec un système Zeiss AxioCam MRm et le logiciel AxioVision 4.2. La colocalisation a également été effectuée grâce au logiciel AxioVision 4.2.

C : Les cellules BHK, exprimant de manière stable les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$, ont été utilisées pour réaliser des centrifugations différentielles afin de séparer les différents compartiments cellulaires (Ly = lysat total). 100 μ g de protéines ont été déposées par puits, séparées sur gel de 12%, électro-transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL.

D : Les cellules A549, exprimant de manière endogène les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, ont été utilisées pour réaliser des centrifugations différentielles afin de séparer les différents compartiments cellulaires. 100 μ g de protéines ont été déposées par puits, séparées sur gel de 12%, électro-transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par immunodétection, en utilisant l'anti- $G\alpha_{12}$ ou l'anti- $G\alpha_{13}$ et le kit ECL.

Il s'agit d'une distribution périnucléaire caractéristique d'une localisation réticulaire (Fig. 6A). La confirmation a été obtenue par les résultats de colocalisation avec la calnexine (CNX) ; une protéine transmembranaire résidente du RE utilisée comme marqueur spécifique de ce compartiment. Dans les cellules BHK-21 exprimant de manière stable les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ étiquetées par le drapeau HA, les résultats de l'immunocolocalisation montrent une couleur jaune (overlay) résultant de la superposition des couleurs vertes (HA) et rouges (CNX), indiquant que ces deux protéines colocalisent avec la CNX et confirmant qu'elles sont exprimées principalement dans le RE (Fig. 6B). Il est aussi à noter qu'une faible détection au niveau de la membrane plasmique a été observée, appuyant l'idée que ces protéines sont aussi exprimées à ce niveau.

Une autre approche pour déterminer la localisation subcellulaire des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ a été l'approche biochimique. En effet, il est possible de séparer les différents organites cellulaires, entre autres par la technique de centrifugation différentielle.

Cette technique a été utilisée pour séparer différents organites intracellulaires à partir des cellules BHK-21 exprimant de manière stable les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ étiquetées HA et les cellules pulmonaires A549, exprimant quant à elles les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ de manière endogène (Fig. 6C et 6D).

Les résultats montrent que dans les cellules BHK-21, les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont présentes dans les mitochondries (Mito) avec une faible expression pour $G\alpha_{12}$, dans les microsomes enrichis en RE (Mic) et dans les ribosomes (Rib). Elles sont en revanche absentes du cytosol (Cyt) (Fig. 6C). Dans les cellules A549, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont principalement exprimées au niveau du RE, en faible quantité dans les mitochondries et les ribosomes, et absentes du noyau (Ny) et du cytosol (Cyt) (Fig. 6D). Dans ces deux lignées cellulaires, le profil de fractionnement subcellulaire des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ est identique, avec des différences dans les niveaux d'expression probablement dues aux origines (rénal pour BHK et pulmonaire pour A549) et au mode d'expression (exogène pour BHK et endogène pour A549).

Nos résultats démontrent pour la première fois que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ présentent une localisation principalement réticulaire et confirment ainsi les résultats de spectrométrie de masse.

E) Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ colocalisent avec la protéine CFTR sauvage et mutée

70% et 100% des protéines CFTR sauvages et mutées (F508del), respectivement, sont bloquées et dégradées rapidement dans le RE (Varga *et al.*, 2004; Loo *et al.*, 2008). Le fait que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ soient aussi localisées dans le RE laisse penser que ces deux protéines peuvent colocaliser avec CFTR dans ce même compartiment. Afin d'apporter une réponse à cette question, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence et de fractionnement subcellulaire sur gradient discontinue de sucrose.

Pour l'immunofluorescence, nous avons utilisé la lignée cellulaire IB3-1 (Fig. 7A) qui exprime de manière endogène la protéine CFTR-F508del et les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, la lignée COS-1 et la lignée HEK-293 (Fig. 7C & 7D) qui expriment d'une manière endogène $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ et transitoirement CFTR-F508del-HA, et la lignée BHK-21 (Fig. 7B) qui coexprime stablement la protéine CFTR sauvage étiquetée HA et les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ étiquetées GFP. Les résultats montrent une parfaite colocalisation, indiquée par la couleur jaune résultant de la superposition des couleurs vertes et rouges, des protéines CFTR sauvages ou mutées avec les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ (Fig. 7A, 7B, 7C & 7D). Le même résultat a été obtenu avec les protéines hyperactives ; $G\alpha_{12}QL$ et $G\alpha_{13}QL$ (résultats non montrés). En présence de la protéine CFTR sauvage, nous avons aussi noté une colocalisation entre la forme complexe-glycosylée et les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$, confirmant par la même occasion la présence de ces deux protéines au niveau de la membrane plasmique (Fig. 7B). Ces résultats montrent aussi que la colocalisation entre la forme core-glycosylée de CFTR sauvage ou mutée et les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ a lieu dans le RE.

Pour appuyer ce dernier constat, nous avons réalisé des expériences de fractionnement subcellulaire sur gradient discontinue de sucrose.

La différence par rapport à la centrifugation différentielle réside dans la pureté de la fraction réticulaire obtenue. En effet, avec la technique de centrifugation différentielle, la fraction microsomale (Mic) obtenue contient en plus du RE, le Golgi, la membrane plasmique et les vésicules intermédiaires (endosomes et vésicules cargo). En revanche, le fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose permet d'obtenir une fraction riche à 95% en RE.

Ce facteur d'enrichissement a été obtenu par la mesure d'activité enzymatique de marqueur spécifique du RE et par le calcul de rendement par rapport à l'homogénat de départ (De Keukeleire *et al.*, 2008). Cette technique a été utilisée sur les cellules BHK exprimant de

manière stable les protéines CFTR, CFTR-F508del, $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ étiquetées HA. La présence ou non de ces protéines ainsi que celle de la protéine calnexine (CNX) dans les différentes fractions a été révélée par western-blot (Fig. 7E et 7F).

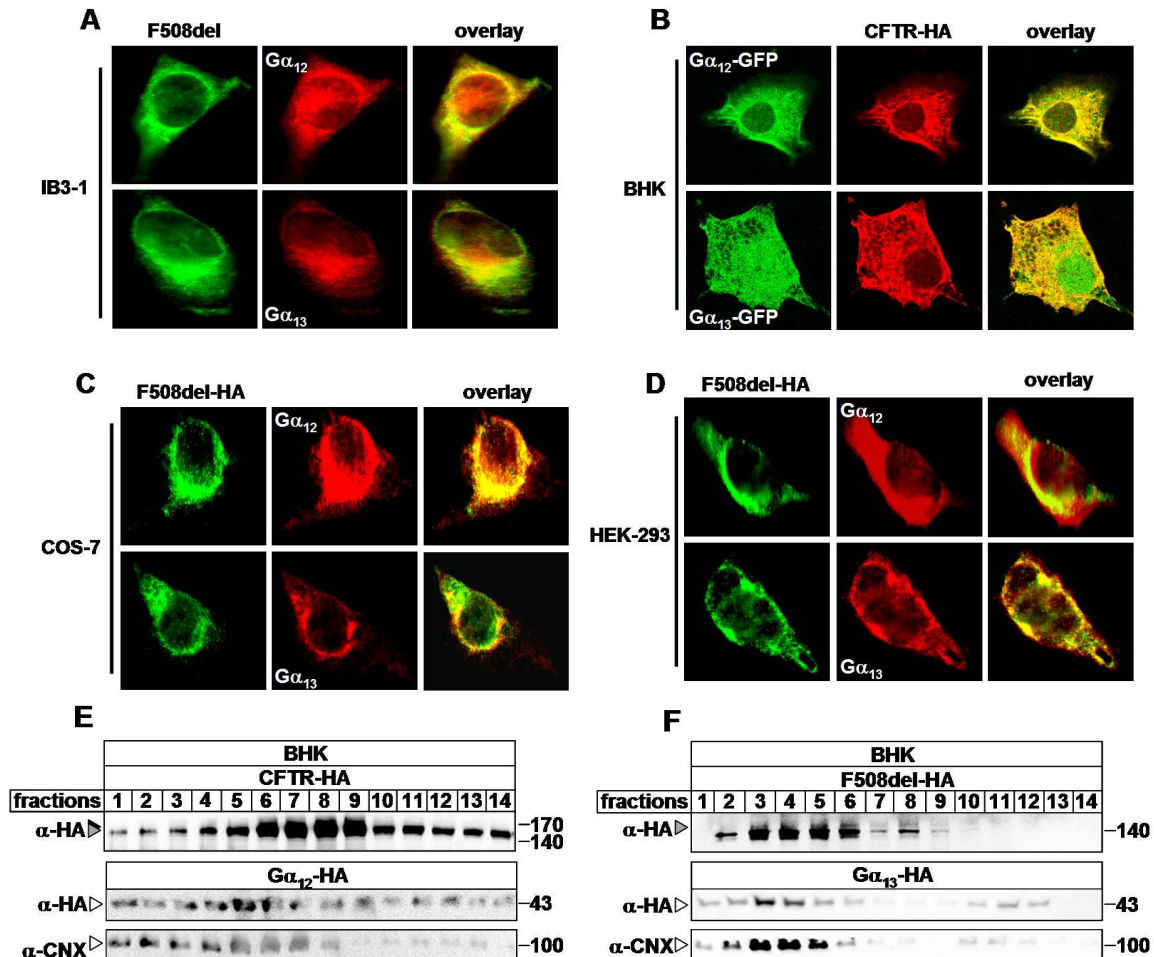


Figure 7 : Colocalisation de CFTR sauvage et mutée avec les protéines $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ et la CNX.

A : Les cellules IB3-1, exprimant de manière stable la protéine CFTR-F508del étiquetée HA et de manière endogène les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-HA et l'anti- $G\alpha_{12}$ ou - $G\alpha_{13}$. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa488 (pour le HA) et d'un anticorps anti-lapin couplé au TRITC (pour $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$).

B : Les cellules BHK-21, exprimant de manière stable la protéine CFTR-F508del étiquetée HA et les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ étiquetées GFP, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-HA. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé au TRITC (pour le HA), la GFP a été détectée par autofluorescence.

C : Les cellules COS-7, exprimant de manière stable la protéine CFTR-F508del étiquetée HA et de manière endogène les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-HA et l'anti- $G\alpha_{12}$ ou - $G\alpha_{13}$. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa488 (pour le HA) et d'un anticorps anti-lapin couplé au TRITC (pour $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$).

D : Les cellules HEK-293, exprimant de manière stable la protéine CFTR-F508del étiquetée HA et de manière endogène les protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-HA et l'anti- $G\alpha_{12}$ ou - $G\alpha_{13}$. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa488 (pour le HA) et d'un anticorps anti-lapin couplé au TRITC (pour $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$).

Les images ont été acquises avec un microscope à épifluorescence à l'aide d'un objectif 63x à immersion avec un système Zeiss AxioCam MRm et le logiciel AxioVision 4.2. La colocalisation a été effectuée grâce au logiciel Photoshop.

E : Les cellules BHK-21, exprimant de manière stable les protéines CFTR ou $G\alpha_{12}$ étiquetées HA, ont été utilisées pour réaliser un fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose. 10 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7% pour CFTR et 12% pour $G\alpha_{12}$, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant les anti-HA et anti-CNX et le kit ECL. La flèche grise correspond à la forme immature et la flèche noire correspond à la forme mature de CFTR.

F : Les cellules BHK-21, exprimant de manière stable les protéines CFTR-F508del ou $G\alpha_{13}$ étiquetées HA, ont été utilisées pour réaliser un fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose. 10 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7% pour CFTR-F508del et 12% pour $G\alpha_{13}$, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant les anti-HA et anti-CNX et le kit ECL. La flèche grise correspond à la forme immature de CFTR-F508del.

Les résultats montrent que nous avons eu 14 fractions allant de la fraction la plus dense (1) à la fraction la plus légère (14). La caractérisation enzymatique nous a permis d'identifier trois types de fractions. De 1 à 6, il s'agit des fractions réticulaires, les mêmes qui nous ont servi pour identifier par spectrométrie de masse les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$. Les fractions de 7 à 10 qui correspondent aux lysosomes, lieu de dégradation par excellence de la protéine CFTR sauvage et d'une partie de la protéine F508 présente au niveau de la membrane plasmique après correction (Okiyoneda *et al.*, 2010; Barrière *et al.*, 2011). Finalement, les fractions 11-14 correspondent à l'appareil de Golgi, à la membrane plasmique, aux vésicules de sécrétion et aux endosomes (De Keukeleire *et al.*, 2008). Les résultats d'immunodétection, en utilisant les anticorps anti-HA, montrent une distribution des protéines CFTR sauvages et mutées conforme à celle observée en immunofluorescence. Alors que la protéine mutée est présente uniquement au niveau du RE, la protéine CFTR sauvage est présente dans toutes les fractions avec une forme immature exprimée uniquement dans la fraction réticulaire, et une forme mature révélée dans toutes les fractions (Fig. 7E et 7F). La détection des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ montre que ces deux protéines sont exprimées principalement dans le RE où elles colocalisent avec les protéines CFTR sauvages et mutées. Ce résultat est confirmé par la détection dans les mêmes fractions de la protéine CNX (Fig. 7E et 7F). Nos résultats montrent aussi que les protéines $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$, principalement $G\alpha_{12}$, sont exprimées au niveau de la membrane plasmique.

L'ensemble de ces résultats montre que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont principalement exprimées dans le RE où elles coexistent avec la forme core-glycosylée de la protéine CFTR sauvage et mutée, et conforte notre hypothèse d'une implication directe ou indirecte de ces protéines dans la dégradation de CFTR.

F) La protéine $G\alpha_{12}$, et non $G\alpha_{13}$, interagit avec les protéines chaperonnes CNX et HSP90

Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont exprimées dans le RE, compartiment où elles colocalisent non seulement avec la forme immature de CFTR sauvage et mutée, mais aussi avec les protéines chaperonnes CNX, HSP90, HSP70 et BiP (données non montrées ; Fig. 6B, 7E et 7F). Ces résultats suggèrent naturellement qu'une interaction entre $G\alpha_{12}$ et/ou $G\alpha_{13}$ et ces différentes protéines pourrait exister dans le RE.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons réalisé deux types d'expériences : l'immunoprécipitation et la méthode de « Proximity Ligation Assay » (PLA). Les deux méthodes utilisent les anticorps pour l'identification de l'interaction.

Cependant, si la finalité est la même, identifier l'existence d'une interaction entre deux protéines, l'interprétation des résultats reste très spécifique. En effet, l'immunoprécipitation est une technique biochimique qui dépend de plusieurs paramètres dont le pH, l'osmolarité, la force ionique et l'affinité d'une protéine par rapport à l'autre, alors que le PLA est le résultat d'une interaction physique dans un environnement physiologique (cellule). Aujourd'hui, le PLA constitue donc la vérification finale, à l'échelle cellulaire, de l'absence ou la présence d'une interaction protéine-protéine obtenue par l'immunoprécipitation.

Pour toutes ces raisons, nous avons étudié l'interaction des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec les protéines cibles par immunoprécipitation et l'avons confirmé par le PLA.

Dans un premier temps, en utilisant des extraits protéiques préparés à partir des cellules COS-7 exprimant transitoirement les protéines CFTR sauvage ou mutée (F508del) et la protéine GFP- $G\alpha_{12}$, nous avons cherché à détecter par immunoprécipitation des interactions entre ces protéines. Bien que les protéines cibles soient bien exprimées dans les cellules COS-7 (Fig. 8A), l'immunoprécipitation n'as pas permis de révéler des interactions entre la protéine CFTR sauvage ou mutée et la protéine $G\alpha_{12}$ (Fig. 8B). Les mêmes résultats ont été obtenus avec la protéine $G\alpha_{13}$ (données non montrées), suggérant que l'implication des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de CFTR au niveau du RE est probablement indirecte.

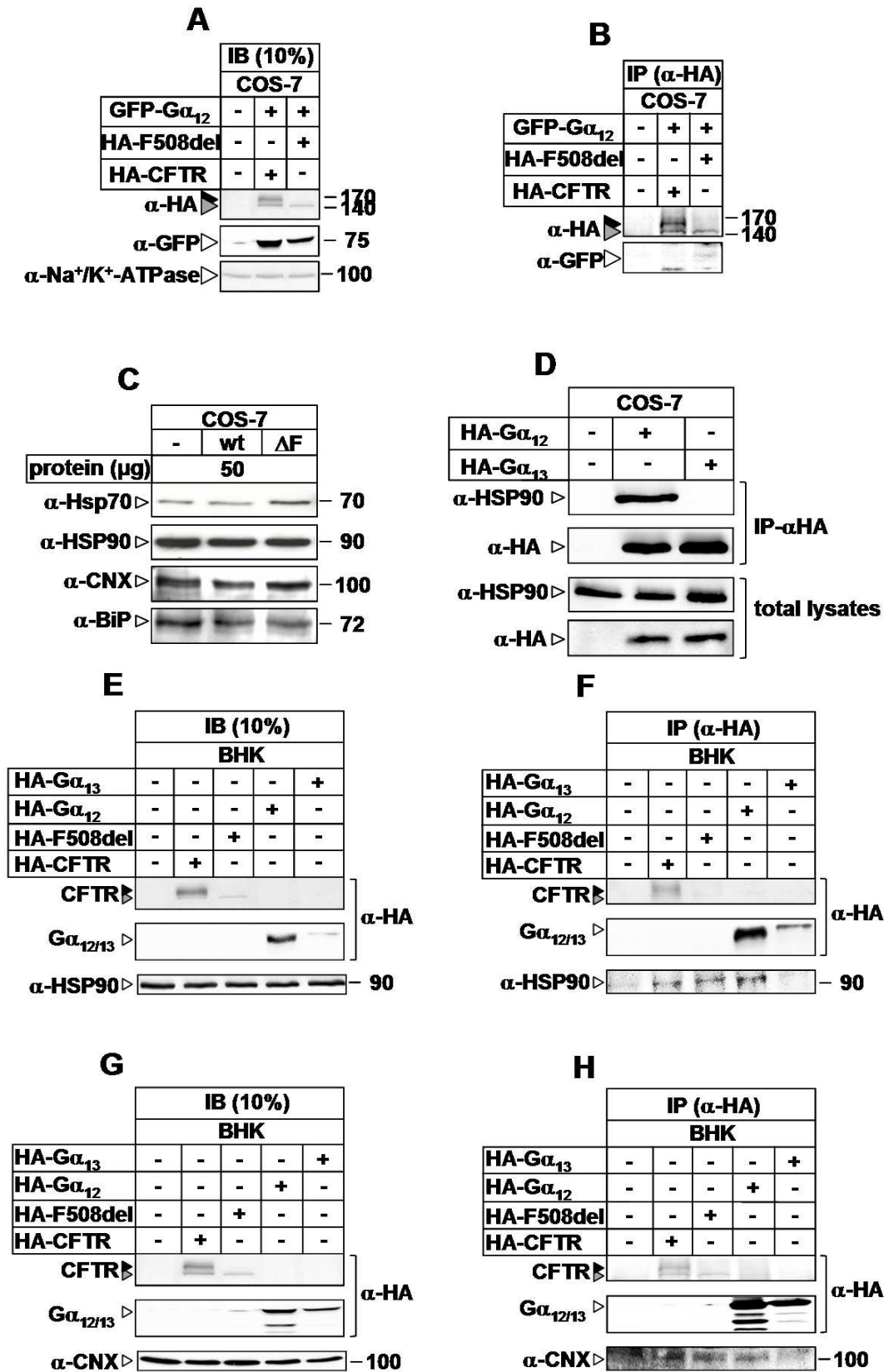


Figure 8 : Interaction des protéines CFTR sauvage, CFTR-F508del, G α_{12} et G α_{13} avec les protéines chaperonnes HSP90 et CNX par immunoprécipitation.

A et B : Les cellules COS-7 exprimant de manière transitoire les protéines G α_{12} étiquetées GFP et CFTR sauvages ou mutées étiquetées HA ont été utilisées. 10% des protéines ont été séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose (A). Les 90% restants ont été immunoprécipités avec l'anti-

HA puis séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose (**B**). La présence des protéines a été révélée à l'aide des anticorps anti-HA ou anti-GFP et du kit ECL. La Na^+/K^+ -ATPase sert de contrôle interne. La flèche grise correspond à la forme immature et la flèche noire correspond à la forme mature de CFTR.

C : 50 μg de protéines extraites des cellules COS-7 sauvages ou exprimant de manière transitoire la protéine CFTR sauvage ou mutée ont été déposés par puits, séparés sur gel de 9%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant les anti-HSP70, anti-HSP90, anti-CNX et anti-BiP et le kit ECL.

D : Les cellules COS-7 exprimant de manière transitoire les protéines $\text{G}\alpha_{12}$ ou $\text{G}\alpha_{13}$ étiquetées HA ont été utilisées. 10% des protéines ont été séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose (ligne 1)). Les 90% restants ont été immunoprécipités avec l'anti-HA puis séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose (IP- αHA). La présence des protéines a été révélée à l'aide des anticorps anti-HA et anti-HSP90 et du kit ECL.

E, F, G et H : Les cellules BHK-21 exprimant CFTR sauvage, CFTR-F508del, $\text{G}\alpha_{12}$ ou $\text{G}\alpha_{13}$ étiquetées HA ont été utilisées. 10% des protéines ont été séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose (**E** et **G**). Les 90% restants ont été immunoprécipités avec l'anti-HA puis séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose (**F** et **H**). La présence des protéines étiquetées ainsi que des protéines chaperonnes a été révélée à l'aide des anticorps anti-HA et anti-HSP90 (**E** et **F**) ou anti-HA et anti-CNX (**G** et **H**) et du kit ECL. La flèche grise correspond à la forme immature et la flèche noire correspond à la forme mature de CFTR.

Les protéines $\text{G}\alpha_{12}$ et $\text{G}\alpha_{13}$ colocalisent aussi avec des protéines chaperonnes résidentes du RE (CNX, BiP) ou associées au RE (HSP70, HSP90). Ces chaperonnes, qui participent au contrôle de la qualité du repliement et à la dégradation des protéines incorrectement repliées et/ou incorrectement assemblées, ont été impliquées, par interaction directe, dans la reconnaissance et la dégradation de CFTR-F508del (Yang *et al.*, 1993; Pind *et al.*, 1994; Loo *et al.*, 1998). Pour cela, nous avons aussi étudié l'interaction de $\text{G}\alpha_{12}$ et $\text{G}\alpha_{13}$ avec ces protéines. Nous avons dans un premier temps caractérisé l'expression des protéines chaperonnes dans les cellules COS-7 exprimant transitoirement la protéine CFTR sauvage ou mutée. Les résultats montrent que ces protéines chaperonnes sont bien exprimées dans les cellules COS-7 et que la présence de CFTR sauvage ou mutée n'influence pas significativement ni leur niveau ni leur profil d'expression (Fig. 8C).

Ces mêmes cellules ont été utilisées pour étudier l'interaction entre $\text{G}\alpha_{12/13}$ et les protéines chaperonnes. Après avoir exprimé transitoirement dans les cellules COS-7 les protéines $\text{G}\alpha_{12}$ et $\text{G}\alpha_{13}$ étiquetées HA, nous avons étudié par immunoprécipitation leur interaction possible avec les chaperonnes. Mis à part la protéine HSP90 (Fig. 8D) pour laquelle nous avons pu détecter une interaction avec $\text{G}\alpha_{12}$, et non pas avec $\text{G}\alpha_{13}$, aucune autre interaction avec HSP-70 et BiP n'a pu être identifiée (résultats non montrés). Ces résultats confirment ceux trouvés par d'autres groupes montrant que seule la protéine $\text{G}\alpha_{12}$ interagit avec HSP90 (Vaiskunaite *et al.*, 2001).

Les mêmes expériences ont été répétées, mais sur des extraits protéiques préparés à partir des cellules BHK exprimant stablement les protéines CFTR, CFTR-F508del, $\text{G}\alpha_{12}$ ou

$G\alpha_{13}$ décorées par l'étiquette HA. Ces expériences confirment l'interaction de $G\alpha_{12}$ avec HSP90 et révèlent pour la première fois la présence d'une interaction entre la CNX et $G\alpha_{12}$, et pas avec $G\alpha_{13}$ (Fig. 8E, 8F, 8G et 8H).

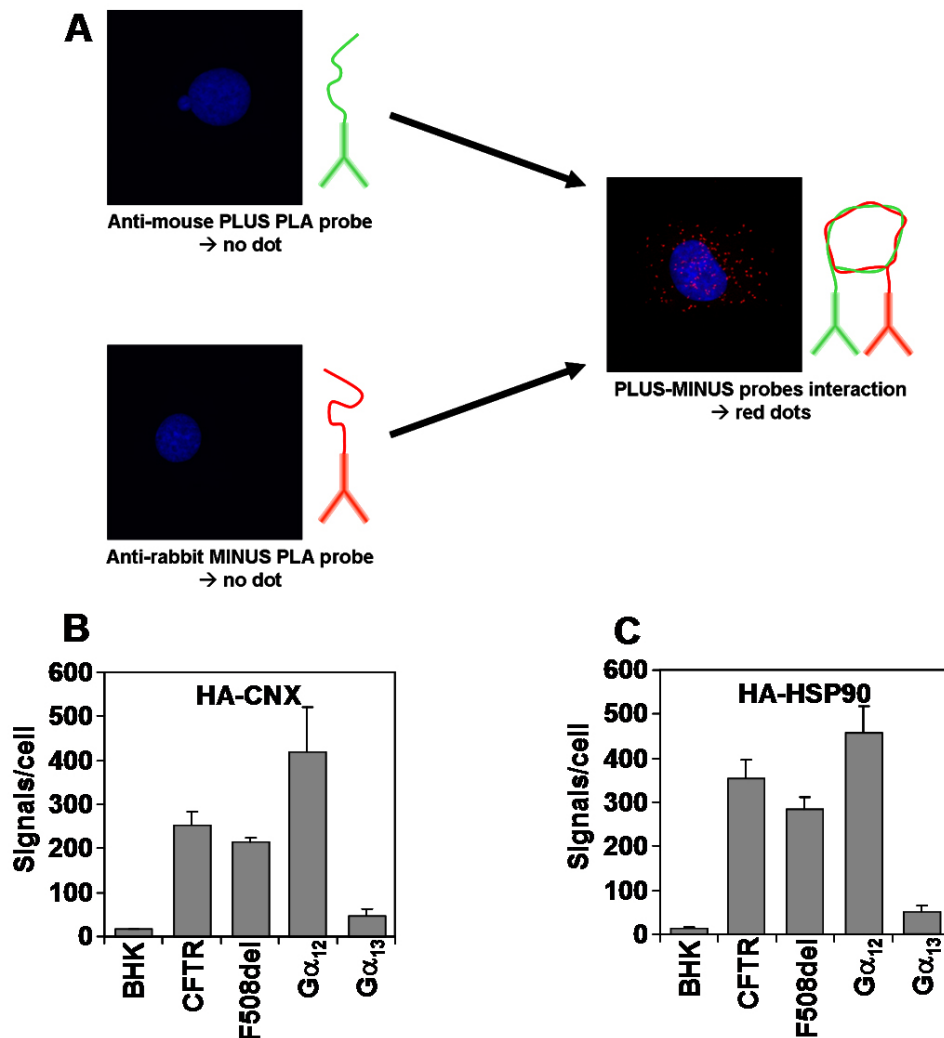


Figure 9 : Interaction des protéines CFTR sauvage, CFTR-F508del, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec les protéines chaperonnes HSP90 et CNX par PLA.

A : Principe de la technique du « Proximity Ligation Assay » (PLA). Des anticorps PLUS ou MINUS seuls ne donnent aucun signal. Lorsque les anticorps PLUS et MINUS sont assez proche, les séquences d'ADN couplées aux anticorps s'hybride, il en résulte l'apparition de points rouges en microscopie (voir Matériels et Méthodes X.C.)

B et C : Quantification du PLA pour les protéines CFTR sauvage, CFTR-F508del, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ et les protéines HSP90 et CNX dans les cellules BHK-21 exprimant CFTR sauvage, CFTR-F508del, $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ étiquetées HA. Les images ont été acquises avec un microscope confocal TCS SP2 (*Leica*) à l'aide d'un objectif 63x et du logiciel Leica confocal software. La colocalisation a également été effectuée grâce au logiciel Leica confocal software.

Les résultats obtenus par immunoprécipitation ont été confirmés par ceux obtenus par la méthode PLA, dont le principe et un résultat représentatif sont indiqués sur la figure 9A.

Avec cette technique, nous n'avons pu mettre en évidence aucune interaction entre les protéines $G\alpha_{12/13}$ et CFTR, F508del, BiP ou HSP70. Cependant, nous avons confirmé l'interaction de la CNX avec CFTR, F508del et $G\alpha_{12}$ avec environ 250, 210 et 410 interactions par cellule, respectivement (Fig. 9B). Concernant l'interaction entre la CNX et $G\alpha_{13}$, nous avons détecté moins de 50 interactions, ce qui correspond environ au niveau du bruit de fond (cellules BHK), confirmant également l'absence ou la très faible interaction entre $G\alpha_{13}$ et la CNX (Fig. 9B).

Les résultats montrent aussi l'existence d'interactions de HSP90 avec CFTR, F508del et $G\alpha_{12}$ avec environ 360, 280 et 470 interactions par cellule, respectivement (Fig. 9C). Cette fois encore, les résultats concernant $G\alpha_{13}$ tendent à montrer que cette dernière n'interagit pas, ou très faiblement, avec HSP90 (Fig. 9C).

L'ensemble de ces résultats montre que la protéine CFTR sauvage ou mutée, ainsi que la protéine $G\alpha_{12}$, interagissent avec les protéines chaperonnes HSP90 et CNX. L'effet de $G\alpha_{12}$ sur la dégradation de CFTR pourrait donc passer par une interaction indirecte, *via* les protéines chaperonnes. Etant donné la faible, voir l'absence, d'interaction entre $G\alpha_{13}$ et les chaperonnes CNX et HSP90, nous n'avons continué notre étude qu'avec la protéine $G\alpha_{12}$.

G) La protéine $G\alpha_{12}$ stabilise la protéine CFTR mutée F508del

Nos résultats ont montré que $G\alpha_{12}$ est impliquée dans la dégradation réticulaire GTP-dépendante de la forme immature de CFTR sauvage et mutée, et qu'elle est exprimée dans le RE où elle est colocalisée avec la forme immature de CFTR sauvage et mutée, et avec les chaperonnes HSP90 et CNX. Nous avons aussi montré que la protéine $G\alpha_{12}$ n'interagit pas avec CFTR sauvage et mutée mais interagit avec les chaperonnes HSP90 et CNX.

Les formes immatures mal repliées de CFTR sauvage (70%) et mutée (100%) sont retenues et rapidement éliminées au niveau du RE par le même processus de reconnaissance et de dégradation (Zhang *et al.*, 1998). Partant de cette observation, nous nous sommes concentrés, pour la suite de notre travail, uniquement sur l'effet de $G\alpha_{12}$ sur la dégradation de la protéine CFTR-F508del.

Afin de déterminer plus précisément le rôle de $G\alpha_{12}$ dans la stabilité de la protéine CFTR mutée, nous avons étudié l'effet de la surexpression transitoire (COS-7) ou stable (BHK) de $G\alpha_{12}$ sauvage ou mutée ($G\alpha_{12}QL$) sur le niveau basal d'expression et la stabilité de CFTR-F508del.

1) Expression transitoire

La co-expression de CFTR mutée avec $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{12}QL$ nous a permis d'observer une augmentation de l'expression basale de CFTR-F508del (Fig. 10A et 10B). Cette augmentation ne semble pas être dépendante de la quantité de $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{12}QL$ transfectée. En effet, le niveau d'expression de CFTR-F508del n'a pas été influencé par le doublement de la quantité de $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{12}QL$ (Fig. 10A et 10B).

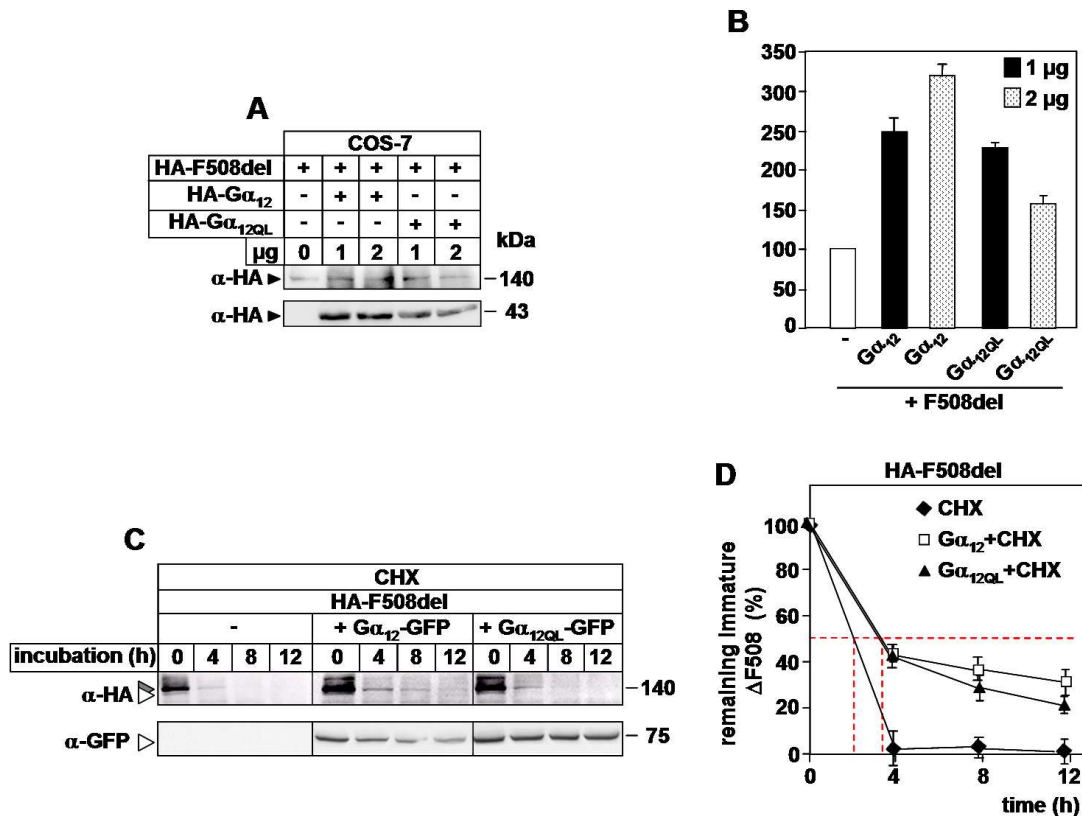


Figure 10 : Effet de l'expression de $G\alpha_{12}$ sur la quantité de CFTR-F508del exprimée de manière transitoire dans les cellules COS-7.

A : Les cellules COS-7 ont été transfectées transitoirement avec 1 μ g de plasmide exprimant F508del étiquetée HA seul ou avec 1 ou 2 μ g de plasmide exprimant $G\alpha_{12}$ sauvage ou mutée ($G\alpha_{12}QL$). 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anti-HA et le kit ECL.

B : Quantité de CFTR-F508del exprimée en pourcentage par rapport à son expression dans les cellules COS-7 transfectées uniquement avec le plasmide exprimant F508del étiquetée HA. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne \pm S.E (n= 3).

C : Les cellules BHK-21 exprimant stablement CFTR-F508del étiquetée HA seule ou CFTR-F508del et $G\alpha_{12}$ sauvage ou mutée étiquetée GFP ont été incubées à différents temps en présence de CHX (100 μ g/ml). 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'AM anti-CFTR 24.1 et le kit ECL. Les flèches grises et blanches indiquent respectivement les formes B et A.

D : Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à son expression initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne \pm S.E (n= 4).

Sur un plan quantitatif, la figure 10B montre que la surexpression de 1 μg ou 2 μg de $\text{G}\alpha_{12}$ sauvage augmente l'expression de CFTR-F508del respectivement de 2,5 et 3 fois. Alors que dans le cas de la forme mutée ($\text{G}\alpha_{12}\text{QL}$), cette augmentation est de 2,4 et 1,6 fois.

L'ensemble de ces résultats suggère que cette augmentation de l'expression basale pourrait être la conséquence d'un ralentissement de dégradation du CFTR mutée.

2) Expression stable

Afin de nous assurer que l'augmentation de l'expression basale observée en expression transitoire pourrait être la conséquence d'un ralentissement de dégradation de CFTR mutée, et que cet effet ne dépend ni du type cellulaire, ni du mode de transfection, nous avons généré des lignées cellulaires (BHK) exprimant stablement les protéines $\text{G}\alpha_{12}$ sauvages ou mutées étiquetées GFP. Ces lignées ont été obtenues à partir des cellules BHK exprimant déjà de manière stable la protéine CFTR mutée étiquetée HA. Après sélection par l'agent G418, les cellules positives pour leur expression des protéines GFP- $\text{G}\alpha_{12}$ ou GFP- $\text{G}\alpha_{12}\text{QL}$ ont été obtenues après triage par la technique de cytométrie en flux.

Ces cellules ont été par la suite utilisées pour étudier la stabilité de CFTR-F508del en présence de cycloheximide (CHX). Les résultats obtenus montrent tout d'abord que le niveau basal de CFTR-F508del (à $t=0$) est augmenté en présence de $\text{G}\alpha_{12}$ ou $\text{G}\alpha_{12}\text{QL}$ (Fig. 10 C). Ce résultat confirme celui obtenu avec l'expression transitoire. Nous montrons aussi que l'expression constitutive de $\text{G}\alpha_{12}$ ou $\text{G}\alpha_{12}\text{QL}$ ralentit la dégradation de CFTR mutée avec une demi-vie qui passe de $\sim 2\text{h}$ (CFTR-F508del seul) à $\sim 3,5\text{h}$ (Fig. 10 D).

L'ensemble de nos résultats montre pour la première fois que la protéine $\text{G}\alpha_{12}$ est impliquée dans l'élimination de la protéine CFTR-F508del.

H) Implication de HSP90 et de la CNX dans la voie de dégradation dépendante du GTP

A ce stade de nos résultats, nous pouvons logiquement penser que l'implication de $\text{G}\alpha_{12}$ dans la dégradation de CFTR-F508del pourrait se faire d'une manière indirecte. En effet, $\text{G}\alpha_{12}$ n'interagit pas avec CFTR mutée, mais interagit avec les protéines chaperonnes qui contrôlent son niveau de repliement et sa dégradation : CNX et HSP90. De plus, la présence d' AlF_4^- (inhibiteur des protéines G-hétérotrimériques, dont $\text{G}\alpha_{12}$), la déplétion en GTP (molécule nécessaire à l'activation des GTPases), et l'expression de $\text{G}\alpha_{12}$ (augmentation

du pool de protéines qui va s'associer avec HSP90 et CNX) ou de $G\alpha_{12}QL$ (forme hyperactive incapable d'échanger rapidement le GTP par le GDP) inhibent la dégradation de CFTR mutée.

L'ensemble de ces données laissent penser que l'interaction de $G\alpha_{12}$ avec CNX ou HSP90 influencerait le pool disponible de ces chaperonnes pouvant interagir avec la protéine CFTR-F508del.

Pour essayer de répondre à toutes ces questions, nous avons entrepris d'étudier l'effet de ces interactions sur $G\alpha_{12}$, CNX, HSP90 et CFTR mutée.

1) HSP90 stabilise les protéines $G\alpha_{12}$ et CFTR-F508del

Nous avons dans un premier temps étudié l'effet d'une déplétion en GTP, par MPA, sur la stabilité de $G\alpha_{12}$. Bien que $G\alpha_{12}$ soit une GTPase, dont le changement de conformation nécessaire à son activité est très dépendant du GTP, sa stabilité n'est pas influencée par l'absence du GTP (Fig. 11 A et 11C). Le même résultat a été obtenu en présence de BFA, avec une demi-vie ($T_{1/2}$ ~12h) comparable au contrôle (CHX seul) (Fig. 11B et 11C). Le fait que la demi-vie en présence de BFA soit comparable au contrôle montre que cette protéine est éliminée au niveau du RE. Cependant, en présence de geldanamycine (GA), inhibiteur spécifique de la protéine HSP90, la demi-vie de $G\alpha_{12}$ s'effondre pour atteindre ~4h (Fig. 11B et 11C). HSP90 est une protéine chaperonne du système de dégradation associé au RE, et a pour rôle de s'associer avec les protéines mal repliées, de les aider à se replier et de les accompagner jusqu'à leur lieu de dégradation si le repliement n'a pas pu être achevé (Buchner, 1996; Loo *et al.*, 1998). La protéine CFTR-F508del interagit avec HSP90 et l'inhibition de cette interaction par GA accélère sa dégradation (Fig. 11D). Ce résultat est comparable à celui publié par l'équipe de Riordan qui montre que la GA inhibe la maturation de CFTR sauvage et accélère la dégradation de la forme immature au niveau du RE (Loo *et al.*, 1998).

Ces résultats montrent donc que la stabilité de $G\alpha_{12}$ ne dépend pas de la concentration en GTP, et qu'elle est dégradée dans le RE. De plus, la protéine chaperonne HSP90 stabilise les protéines $G\alpha_{12}$ et CFTR mutée.

Il est donc raisonnable de penser que la déplétion en GTP affecterait HSP90 en contrôlant l'activité, et non la stabilité de $G\alpha_{12}$, et que par la suite, HSP90 contrôlerait la stabilité de CFTR.

Les mêmes études sont en cours de réalisations pour évaluer l'effet de la castanospermine, inhibiteur spécifique de la calnexine.

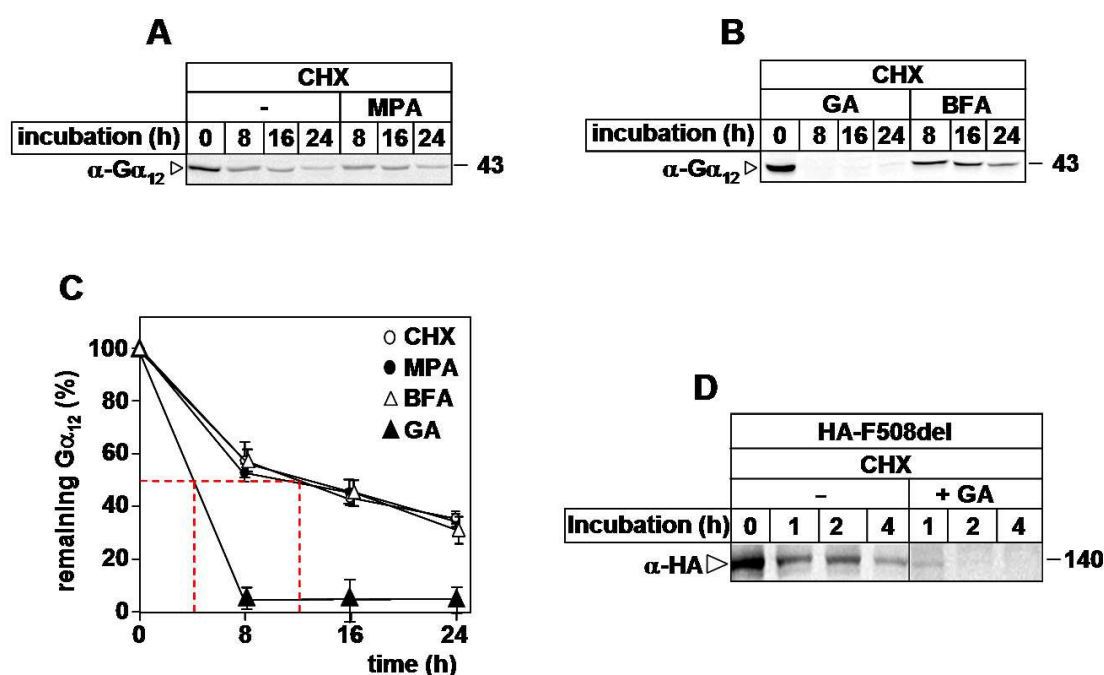


Figure 11 : Effet de HSP90 sur la stabilité de G α_{12} , CFTR-F508del et CFTR sauvage.

A : Les cellules BHK exprimant de manière stable G α_{12} étiquetée HA ont été incubées en présence de CHX (100 μ g/ml) en absence et en présence de MPA (50 μ M). 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 12%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anticorps anti-HA, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

B : Les cellules BHK exprimant de manière stable G α_{12} étiquetée HA ont été incubées en présence de CHX (100 μ g/ml) en présence de Geldanamycine (GA ; 2 μ M) ou de Brefeldine A (BFA ; 5 μ g/ml). 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 12%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anticorps anti-HA, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

C : Quantité de CFTR-F508del restante exprimée en pourcentage par rapport à son expression initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne \pm S.E (n= 5).

D : Les cellules BHK exprimant de manière stable CFTR-F508del étiquetée HA ont été incubées en présence de CHX (100 μ g/ml) en absence et en présence de GA (2 μ M). 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anticorps anti-HA, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

2) Une déplétion en GTP stabilise les protéines HSP90 et CNX

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons évalué le rôle du GTP sur la stabilité des chaperonnes HSP90 et CNX en traitant les cellules BHK-21 avec le MPA. Nos résultats montrent qu'une déplétion en GTP permet de stabiliser HSP90 et la CNX (Fig. 12 A et 12C). En effet, la demi-vie de HSP90 dans les cellules non-traitées est de ~13h30 alors qu'elle est de ~23h dans les cellules traitées par le MPA (Fig. 12B).

Cet effet est encore plus prononcé pour la CNX. La demi-vie de cette chaperonne, de ~19h lorsque les cellules ne sont pas traitées par le MPA, est supérieur à 24h dans des conditions de déplétion en GTP (Fig. 12D).

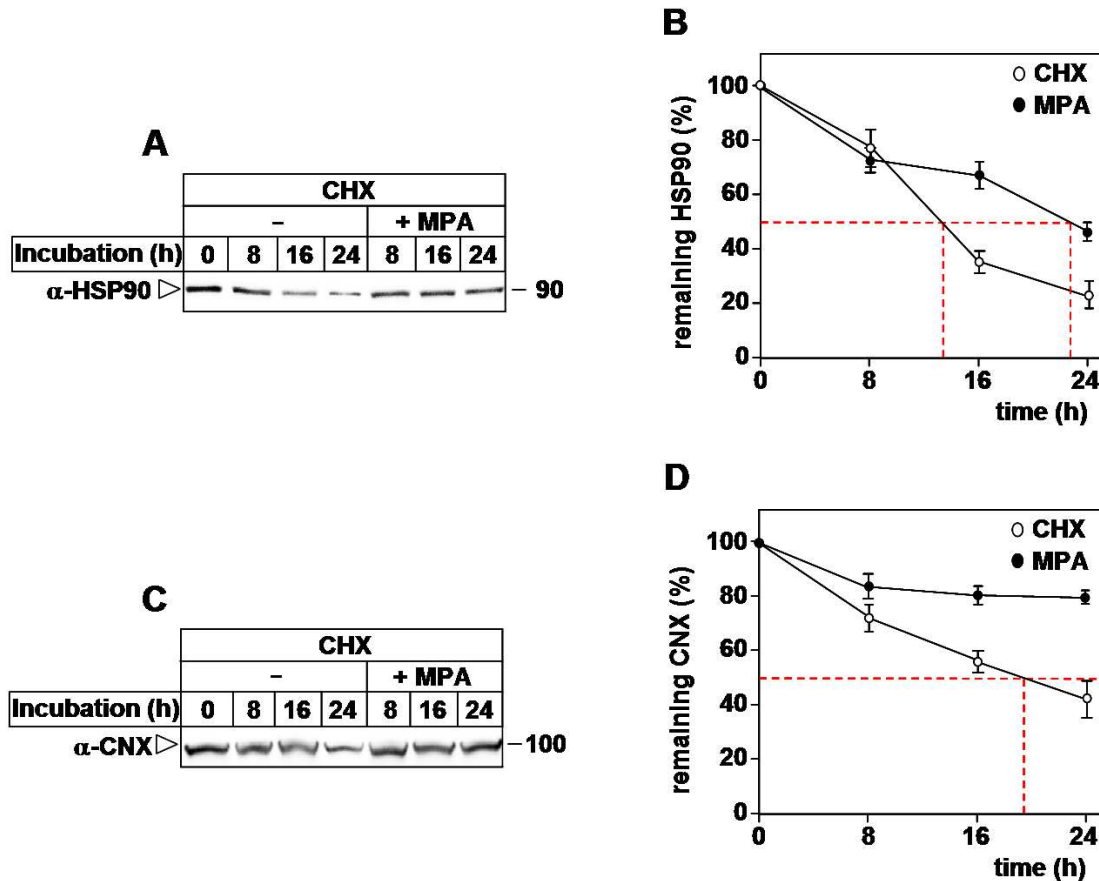


Figure 12 : Effet du GTP sur la stabilité des protéines HSP90 et CNX.

A : Les cellules BHK ont été incubées en présence de CHX (100 μ g/ml) en absence et en présence de MPA (50 μ M). 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 9%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anticorps anti-HSP90, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

B : Quantité de HSP90 restante exprimée en pourcentage par rapport à son expression initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne \pm S.E (n= 4).

C : Les cellules BHK ont été incubées en présence de CHX (100 μ g/ml) en absence et en présence de MPA (50 μ M). 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 9%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anticorps anti-CN X, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

D : Quantité de CNX restante exprimée en pourcentage par rapport à son expression initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne \pm S.E (n= 4).

Ces résultats montrent donc qu'une déplétion en GTP stabilise les protéines chaperonnes HSP90 et CNX. Il est raisonnable de penser que cette stabilisation dépende de l'effet du MPA sur la protéine $G\alpha_{12}$.

3) Le MPA et l'AIF₄⁻ stabilisent l'interaction entre CFTR-F508del et les protéines chaperonnes

Puisque l'effet de Gα₁₂ semble être indirect, nous pouvons légitimement penser que la déplétion en GTP, ou l'utilisation de l'AIF₄⁻, pourrait influencer la stabilité du complexe CFTR-chaperonnes. Pour cette raison, nous avons traité les cellules BHK-21 exprimant de manière stable la protéine CFTR-F508del avec des inhibiteurs du protéasome, l'AIF₄⁻ ou le MPA en présence de CHX. Après immunoprécipitation par l'anti-HA, nous avons déterminé par immunoblot la quantité de CNX et de HSP90 associée à la protéine CFTR-F508del.

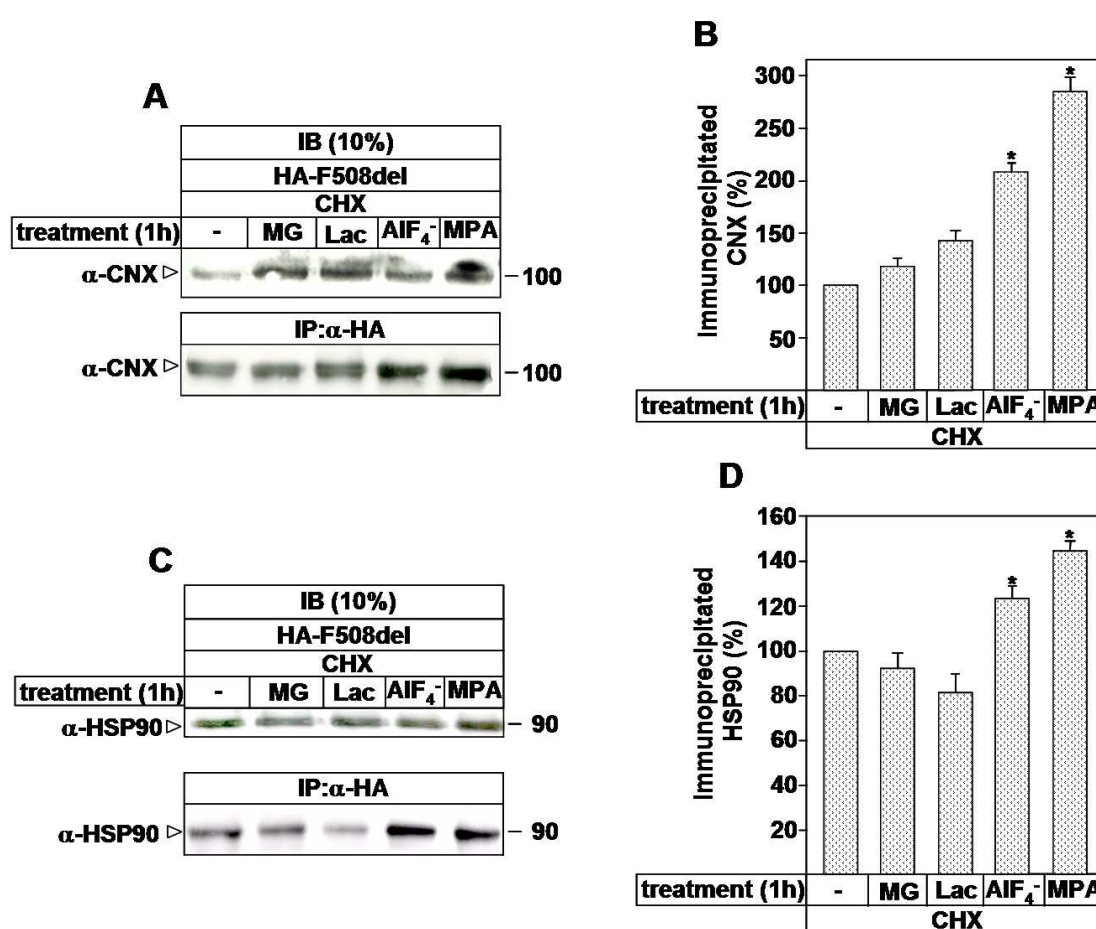


Figure 13 : Effet d'inhibiteurs du protéasome, de l'AIF₄⁻ et du MPA sur la stabilité de l'interaction CFTR-chaperonnes.

A : Les cellules BHK-21 exprimant stablement CFTR-F508del étiquetée HA ont été incubées 1h en présence de CHX (100 µg/ml) en absence et en présence de MG132 (MG ; 10 µM), de Lac (10 µM), d'AIF₄⁻ (10 µM) ou de MPA (50 µM). 10% des protéines ont été séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose. Les 90% restants ont été immunoprécipités avec l'anti-HA puis séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose. La présence de la CNX a été révélée à l'aide de l'anticorps anti-CNX et du kit ECL.

B : Quantité de CNX immunoprécipitée exprimée en pourcentage par rapport à son expression dans les cellules BHK-21 non-traitées. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne ± S.E (n= 3).

C : Les cellules BHK-21 exprimant stablement CFTR-F508del étiquetée HA ont été incubées 1h en présence de CHX (100 µg/ml) en absence et en présence de MG132 (MG ; 10 µM), de Lac (10 µM), d'AIF₄⁻ (10 µM) ou de

MPA (50 μ M). 10% des protéines ont été séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose. Les 90% restants ont été immunoprécipités avec l'anti-HA puis séparés sur gel d'acrylamide à 9%, et électro-transférés sur membrane de nitrocellulose. La présence de HSP90 a été révélée à l'aide de l'anticorps anti-HSP90 et du kit ECL.

D : Quantité de HSP90 immunoprécipitée exprimée en pourcentage par rapport à son expression dans les cellules BHK-21 non-traitées. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne \pm S.E (n= 3).

La figure 13A et 13B montre que l'inhibition du protéasome par le MG132 (MG) ou la lactacystine (lac) augmente très faiblement la stabilité du complexe F508del-CNX. Cette stabilisation s'intensifie en présence d' AlF_4^- , et augmente encore d'avantage en présence de MPA (Fig. 13A et 13B).

Pour l'interaction entre CFTR-F508del-CNX, nous avons obtenu le même résultat que celui observé avec HSP90 (Fig. 13C et 13D). Cependant l'effet avec la Lac et MG132 est moins probant.

Ces résultats nous ont permis de relier le GTP, et donc $\text{G}\alpha_{12}$, à la stabilité du complexe F508del-chaperonnes. Le fait que le cycle de $\text{G}\alpha_{12}$ soit bloqué ou extrêmement ralenti (AlF_4^- et MPA, respectivement) permet une interaction F508del-chaperonne plus importante, très probablement en dissociant le complexe $\text{G}\alpha_{12}$ -chaperonne.

II) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans le contrôle des jonctions intercellulaires : cas de la mucoviscidose

L'épithélium respiratoire est décrit comme un épithélium modérément perméable car la majeure partie de la diffusion d'ions se fait par voie paracellulaire (70-82% dans des cultures primaires d'épithélium nasal et 80% dans les monocouches de cellules Calu-3 (Willumsen & Boucher, 1989; Tamada *et al.*, 2001)).

Le transport paracellulaire est un phénomène passif, entraîné par le gradient électrochimique transépithéliale (Powell, 1981) et est modulé par la perméabilité des jonctions cellulaires (Lewis *et al.*, 1995; Turner, 2006).

CFTR, dont le rôle principal est de permettre un mouvement d'anions à travers l'épithélium (Riordan, 2008), est un facteur important de la sécrétion et de l'absorption de liquide à ce niveau et est supposé être impliqué dans la régulation de la perméabilité paracellulaire (Jiang *et al.*, 1993a; Jiang *et al.*, 1997; Blaug *et al.*, 2001).

Une augmentation importante de la résistance transépithéliale (TER) est donc susceptible de refléter une diminution de la conductance et de la perméabilité des jonctions cellulaires.

Aujourd'hui, des études ont montré que l'une des caractéristiques de la mucoviscidose à l'échelle cellulaire est la diminution de la résistance transépithéliale (TER) (LeSimple *et al.*, 2010; Weiser *et al.*, 2011), synonyme de perte de la sélectivité de la barrière luminale au niveau de l'épithélium pulmonaire.

L'absence de barrière luminale serait à l'origine de l'infiltration du tissu pulmonaire par les bactéries opportunistes comme *Pseudomonas* et *Staphylococcus* (Lee *et al.*, 1999a). Ce processus est supposé être responsable de l'exacerbation de la réponse inflammatoire qui finit par se retourner contre le tissu lui-même, et entraîner sa destruction et par conséquent la perte de la capacité respiratoire des malades mucoviscidosiques. La protéine CFTR serait importante dans ce processus (Reiniger *et al.*, 2007), cependant, les mécanismes à l'origine de cette perte de TER sont à ce jour inconnus.

Plusieurs protéines, individuellement ou en complexe, participent au développement du TER. Parmi ces protéines clés, on trouve deux GTPases de la famille des G-hétérotrimériques : $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ (Meigs *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002). En effet, ces deux protéines jouent un rôle dans le développement et le maintien du complexe jonctionnel au niveau des cellules épithéliales rénales (Meyer *et al.*, 2002; Sabath *et al.*, 2008). Cependant,

leur rôle dans le TER au niveau de l'épithélium pulmonaire reste inconnu. Ainsi, durant mon stage de thèse, j'ai aussi entrepris l'étude de l'expression, la localisation et le rôle de ces deux protéines dans l'épithélium bronchique humain sain et mucoviscidose.

A) La résistance transépithéliale pulmonaire et la mucoviscidose

Une des méthodes les plus fiables pour étudier la formation et le développement des jonctions cellulaires est la mesure de la résistance transépithéliale (TER). Le TER reflète le passage d'ions au travers de l'épithélium, que ce soit par voie para- ou intra-cellulaire. Dans le cas de l'épithélium respiratoire, le TER rend plus compte de la perméabilité paracellulaire, et donc de la qualité des jonctions cellulaires, puisque dans cet épithélium la diffusion d'ions est principalement paracellulaire (Willumsen & Boucher, 1989; Tamada *et al.*, 2001). Plus précisément, la mesure du TER est directement dépendante de la qualité des jonctions serrées, dont la formation est facilitée par la présence des jonctions adhérentes (Niessen, 2007).

Cette méthode nous a donc permis de comparer l'instauration et le développement des jonctions cellulaires de plusieurs lignées épithéliales. Nous avons utilisé, comme lignée contrôle, la lignée MDCK, une lignée rénale bien caractérisée et très étudiée dans le cadre des jonctions cellulaires. Nous avons également utilisé la lignée 16HBE14o- (HBE) exprimant CFTR sauvage de manière endogène et provenant d'un épithélium bronchique humain sain (Cozens *et al.*, 1994; Gruenert *et al.*, 1995), la lignée CFBE41o- (CFBE) exprimant CFTR-F508del/F508del de manière endogène et provenant d'un malade de la MV et provenant de la même région que les cellules HBE (Kunzelmann *et al.*, 1993), et la lignée CFBE-wt qui est la lignée CFBE ayant été corrigée par l'apport du gène *CF* sauvage (Ilek *et al.*, 2008).

Dans un premier temps, nous avons vérifié si nos lignées épithéliales exprimaient la protéine CFTR. Nos résultats indiquent, tant au niveau des ARNm (Fig. 14A et 14B) qu'au niveau protéique (Fig. 14C), que les cellules HBE, CFBE et CFBE-wt expriment CFTR. Cette expression est, comme nous pouvions nous y attendre, plus importante dans les cellules CFBE-wt (Fig. 14A,14B et 14C), qui est le résultat d'une expression après infection par un virus porteur du gène *CF* (Ilek *et al.*, 2008).

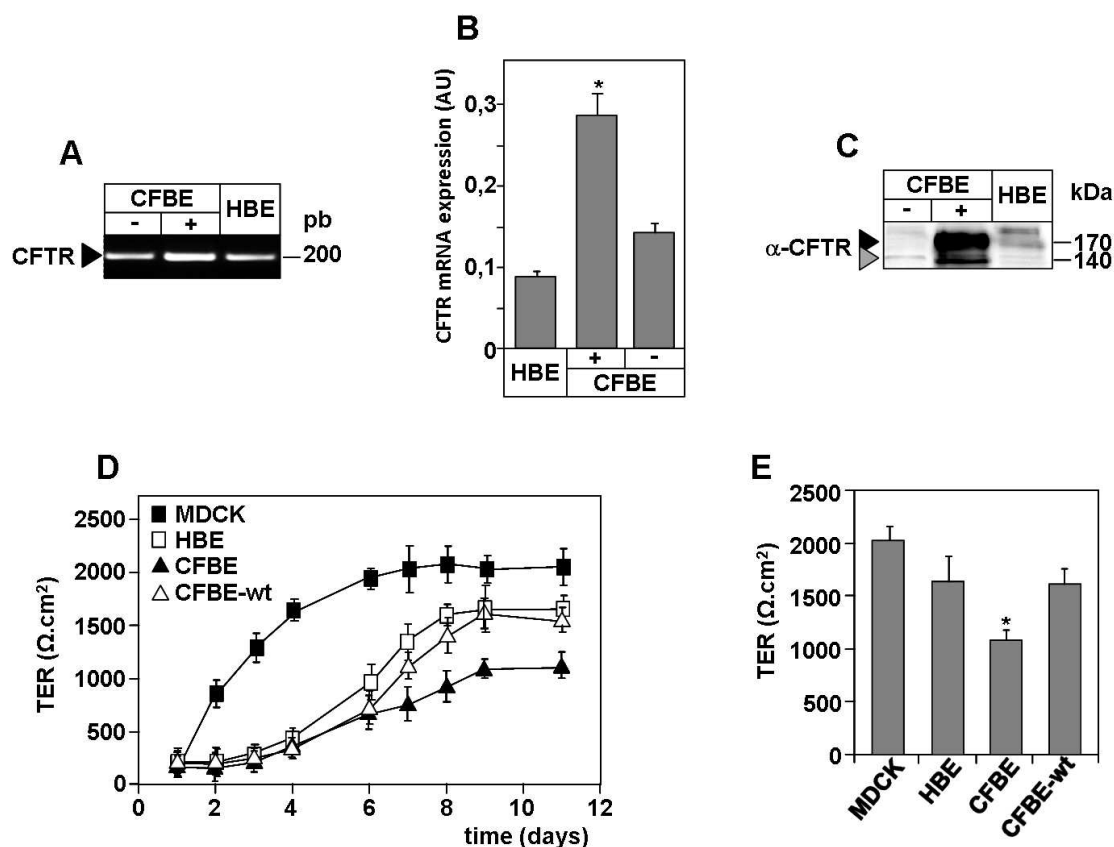


Figure 14 : Expression de CFTR et résistance transépithéliale des cellules HBE, CFBE et CFBE-wt.

A : Amplification, par 20 cycles de PCR, des ADNc issus des ARNm des cellules HBE, CFBE et CFBE-wt. La réaction n'a comporté que 20 cycles pour éviter d'atteindre le plateau d'amplificons. Les échantillons ont ensuite été séparés sur gel d'agarose 2% et révélés par le GelRed sous excitation UV.

B : La quantification des ARNm de CFTR des cellules HBE, CFBE et CFBE-wt a été réalisée par PCR quantitative (qPCR). Les valeurs sont en unité arbitraire. Moyenne \pm S.E (n= 6).

C : Les protéines des cellules HBE, CFBE et CFBE-wt ont été extraites, et 100 μ g ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anticorps monoclonal anti-CFTR (24.1), l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

D : Mesure de la résistance transépithéliale (TER) au cours du temps des cellules MDCK, HBE, CFBE et CFBE-wt. 500.000 cellules/cm² sont ensemencées sur Transwell à J0, les mesures de TER commencent à J1. Moyenne \pm S.E (n= 8).

E : Valeur du TER des cellules MDCK, HBE, CFBE et CFBE-wt à J9. Moyenne \pm S.E (n= 8).

Ensuite, les mesures de TER indiquent que les complexes jonctionnels s'installent rapidement dans les cellules MDCK, le plateau de résistance étant atteint en 6 jours (Fig. 14D). Les cellules épithéliales bronchiques, quant à elles, montrent une augmentation plus lente du TER et atteignent leur plateau à 9 jours (Fig. 14D). Les représentations de TER sous forme d'histogramme pour la suite de cette étude représenteront donc les valeurs de TER mesurées à 9 jours. Ainsi, nos résultats mettent en évidence, pour la première fois, une différence dans la vitesse de mise en place des complexes jonctionnels entre les cellules rénales et pulmonaires, suggérant probablement une différence dans les mécanismes responsables de ce processus.

Nos résultats montrent aussi une diminution de ~30% du TER dans les cellules CFBE par rapport aux cellules HBE (Fig. 14D et 14E). Cette diminution du TER est corrigée par un apport exogène de CFTR sauvage (Fig. 14D et 14E). Ces résultats confirment ceux publiés par les équipes de Hanrahan (LeSimple *et al.*, 2010) et de Schillers (Weiser *et al.*, 2011) qui ont suggéré que la diminution du TER dans les cellules CFBE est probablement le résultat de l'absence au niveau de la membrane apicale de la protéine CFTR. Il est aussi intéressant de noter que les cellules épithéliales bronchiques saines ou corrigées développent un TER ~25% moins important que les cellules rénales, suggérant un passage d'ion plus important dans l'épithélium bronchique.

B) Mauvaise organisation des jonctions cellulaires et stress du cytosquelette dans les cellules mucoviscidiques

1) Organisation des jonctions cellulaires

Les résultats précédents montrent que les cellules épithéliales bronchiques mucoviscidiques développent un TER inférieur à celui des cellules saines. Ce résultat peut être la conséquence d'une désorganisation des protéines des complexes jonctionnels, et/ou d'une diminution de leur expression. L'analyse de l'expression de protéines impliquées dans les jonctions intercellulaires, dans des modèles cellulaires ou des tissus humains, suggère que cette diminution du TER est due en partie à la désorganisation consécutive d'une diminution d'expression de deux protéines jonctionnelles, ZO-1 (jonctions serrées ; TJ) et E-cad (jonctions adhérentes ; AJ).

Pour vérifier nos différentes hypothèses, nous avons caractérisé dans un premier temps l'organisation des TJ et des AJ dans nos cellules épithéliales bronchiques. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence pour étudier la distribution des protéines jonctionnelles. La figure 15A montre que les protéines des jonctions serrées (Occludine = Occ, et ZO-1) des cellules saines HBE forment un contour lisse au niveau de la membrane plasmique, alors que ce contour n'est pas lisse dans les cellules CFBE, mais présente une forme dentelée (Fig. 15A). De plus, nos résultats montrent que la surexpression de CFTR sauvage dans les cellules malades aide à la réorganisation des jonctions serrées (Fig. 15A), confirmant le rôle de CFTR dans la correction du TER dans les cellules CFTBE-wt.

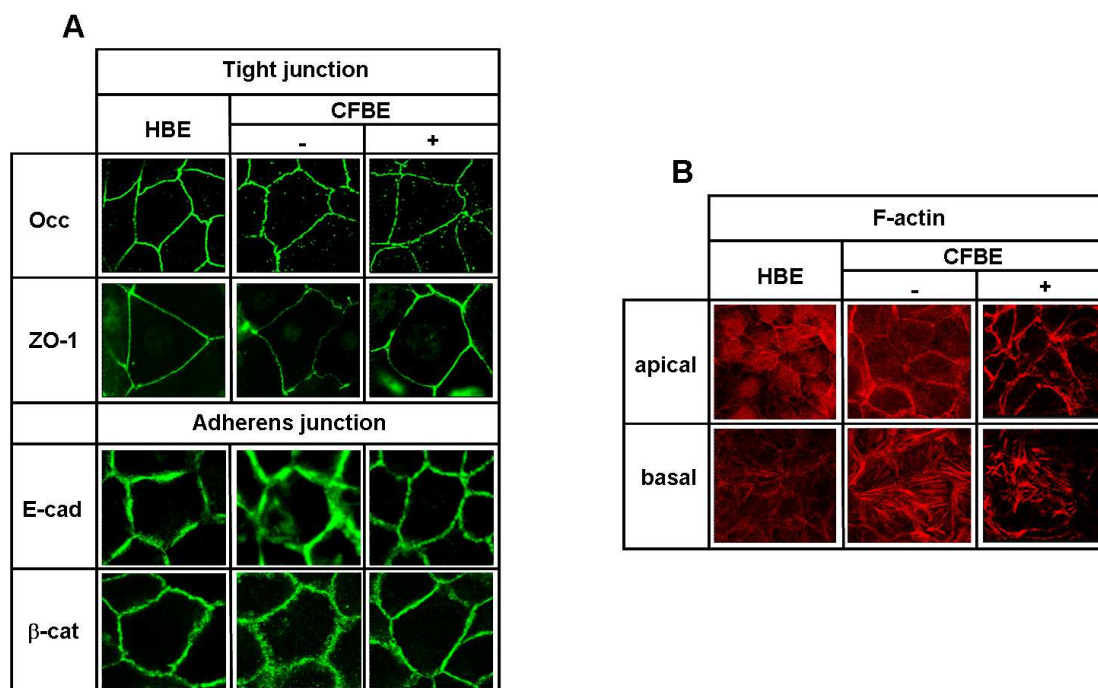


Figure 15 : Organisation membranaire des protéines jonctionnelles et délocalisation de l'actine dans les cellules mucoviscidiques.

A : Les cellules HBE, CFBE et CFBE-wt ont été cultivées sur Transwell, fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-Occ, l'anti-ZO-1, l'anti-E-cad ou l'anti- β -cat. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa488.

B : Des monocouches de cellules HBE, CFBE ou CFBE-wt ont été cultivées sur Transwell. La F-actine a ensuite été marquée à l'aide de phalloïdine couplée au TRITC. Des images des pôles basaux et apicaux des monocouches cellulaires ont été acquises avec un microscope confocal TCS SP2 (*Leica*) à l'aide d'un objectif 63x à émergence et du logiciel Leica confocal software.

Les images ont été acquises avec un microscope à épifluorescence à l'aide d'un objectif 63x à immersion avec un système Zeiss AxioCam MRm et le logiciel AxioVision 4.2.

L'analyse de la répartition des protéines impliquées dans les jonctions adhérentes (AJ) nous a conduits à des observations similaires (Fig. 15A). En effet, l'E-cadhérine (E-cad) et la β -caténine (β -cat) sont concentrées au niveau de la membrane plasmique dans les cellules saines, alors que leur expression est plus éparse dans les cellules malades. Ici encore, nous observons que la surexpression de CFTR sauvage dans les cellules CFBE permet la relocalisation des protéines des AJ au niveau de la membrane plasmique (Fig. 15A).

Ces résultats démontrent que la désorganisation des jonctions cellulaires dans les cellules mucoviscidiques contribue à la diminution du TER dans l'épithélium bronchique. Nous avons également observé qu'une surexpression de CFTR sauvage dans les cellules malades permet une réorganisation convenable des protéines jonctionnelles à la membrane.

2) Stress du cytosquelette

Il est bien établi que les AJ et les TJ sont liées au cytosquelette d'actine *via* les caténines (Paredes *et al.*, 2007) et ZO-1 (Fanning *et al.*, 1998), respectivement. Le fait que les protéines jonctionnelles ne soient pas bien organisées au niveau de la membrane plasmique dans les cellules mucoviscidosique nous a mené à penser que l'organisation du cytosquelette pouvait aussi être modifié. Nous avons donc réalisé un marquage de l'actine grâce à de la phalloïdine couplée à l'agent fluorescent TRITC et avons observé le résultat en microscopie confocale des côtés basaux et apicaux des cellules (Fig. 15B). Ces expériences ont montré, dans les cellules CFBE, une réorganisation de l'actine corticale au niveau basal, menant à la formation de filaments de stress d'actine. De tels changements dans l'organisation du cytosquelette d'actine ont déjà été observés en lien avec une désorganisation des jonctions cellulaires dans des cellules épithéliales rénales (Meyer *et al.*, 2003; Donato *et al.*, 2009).

Ces résultats vont dans le même sens que nos observations concernant la réorganisation des protéines jonctionnelles, en montrant que la correction des cellules CFBE mène à une réorganisation correcte du cytosquelette d'actine semblable à celle observée dans les cellules saines HBE (Fig. 15B).

C) Expression différentielle des protéines jonctionnelles dans les cellules saines et mucoviscidosiques

Nous venons de voir que les cellules CFBE présentent une désorganisation de leurs TJ et AJ par rapport aux cellules HBE. Une telle désorganisation peut être la conséquence d'une dissociation entre les protéines qui forment le complexe jonctionnel. Cette dissociation pourrait avoir comme origine la diminution d'expression d'un ou plusieurs partenaires protéiques.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la formation et le maintien des jonctions serrées (TJ) et des jonctions adhérentes (AJ). Ces protéines sont les protéines zonula occludens 1 (ZO-1) et l'occludine (Occ) pour les TJ, et l'E-cadhérine (E-cad) et la β -caténine (β -cat) pour les AJ. La quantification, par PCR quantitative (qPCR), des ARNm de ces protéines dans les cellules épithéliales bronchiques montre que les protéines ZO-1 et E-cad sont moins exprimées dans les cellules mucoviscidosiques CFBE (Fig. 16A et 16B). *A contrario*, la protéine Occ est surexprimée dans ces cellules, et le niveau d'expression de la β -cat ne varie pas (Fig. 16A et 16B). Les quantifications effectuées sur les ARNm des cellules corrigées montrent que

l'apport de CFTR sauvage dans les cellules malades permet la restauration d'un niveau d'expression de ces ARNm proche de celui observé dans les cellules saines (Fig. 16A et 16B).

Ces observations ayant été réalisées sur les transcrits de ces protéines, nous avons voulu vérifier si tel était le cas au niveau protéique.

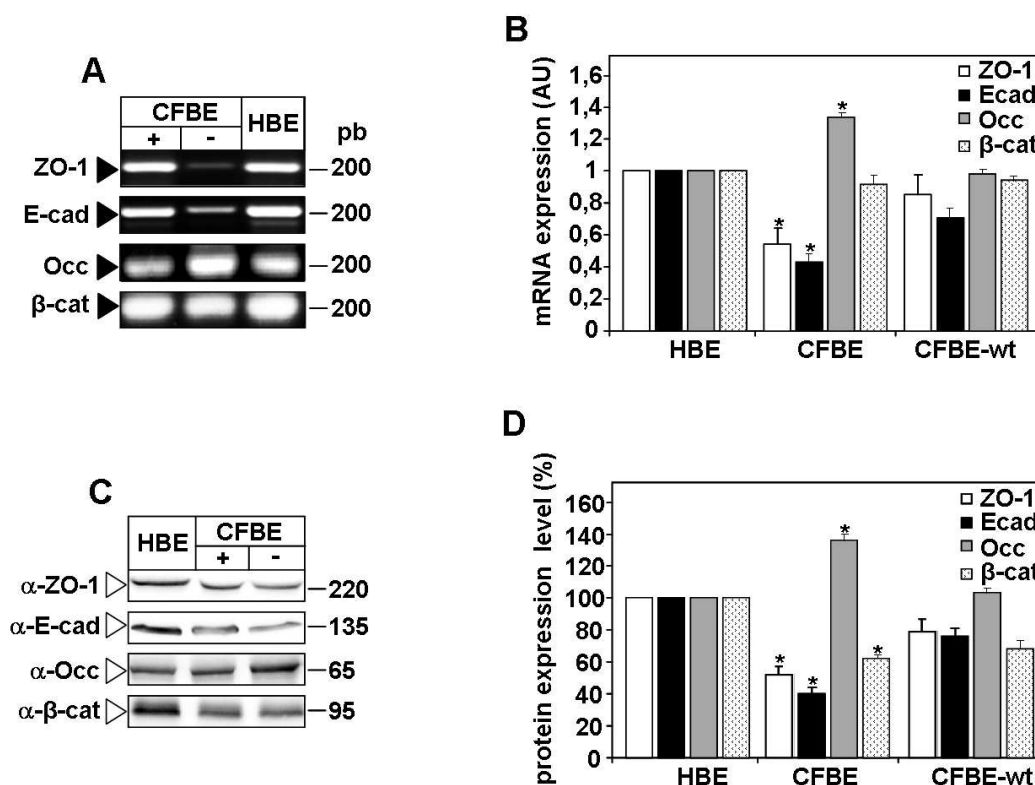


Figure 16 : Expression des protéines jonctionnelles dans les cellules HBE, CFBE et CFBE-wt.

A : Amplification, par 20 cycles de PCR, des ADNc issus des ARNm des cellules HBE, CFBE et CFBE-wt. La réaction n'a comporté que 20 cycles pour éviter d'atteindre le plateau d'amplicons. Les échantillons ont ensuite été séparés sur gel d'agarose 2% et révélés par le GelRed sous excitation UV.

B : La quantification des ARNm de ZO-1, E-cad, Occ et β-cat des cellules HBE, CFBE et CFBE-wt a été réalisée par PCR quantitative (qPCR). Les valeurs sont rapportées à la valeur des cellules HBE. Moyenne ± S.E (n= 7).

C : Les protéines des cellules HBE, CFBE et CFBE-wt ont été extraites, et 100 µg ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant les anticorps monoclonaux anti-E-cad, anti-ZO-1, anti-Occ, anti-β-cat, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

D : Quantités de ZO-1, E-cad, Occ et β-cat exprimées en pourcentage par rapport à leur expression dans les cellules HBE. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne ± S.E (n= 3).

Pour cela, nous avons extrait les protéines de nos lignées épithéliales bronchiques et avons réalisé des expériences de western-blot. Les résultats obtenus corroborent ceux de qPCR, montrant que le niveau d'expression des protéines ZO-1 et E-cad est plus faible dans les cellules CFBE par rapport aux cellules HBE et CFBE-wt (Fig. 16C et 16D). De la même manière, la protéine Occ est plus abondante dans les cellules CFBE (Fig. 16C et 16D). En revanche, la protéine β-cat, pour laquelle le transcrite correspondant n'avait pas montré de

différence entre les trois lignées cellulaires, est moins exprimées dans les cellules CFBE et CFBE-wt que dans les cellules HBE (Fig. 16C et 16D). L'augmentation de l'expression de l'Occ a été suggérée comme une réponse de la cellule pour tenter de consolider les jonctions altérées (Wong, 1997).

A ce stade, l'ensemble de nos résultats montre que la diminution du TER dans les cellules CFBE est la conséquence d'une désorganisation des complexes jonctionnels, elle-même due probablement à une diminution de l'expression de protéines clé du TER : E-cad et ZO-1.

Nos résultats montrent aussi que l'expression de la protéine CFTR sauvage corrige ce défaut.

D) Expression différentielle des protéines jonctionnelles dans les tissus sains et mucoviscidosiques

Nous avons voulu par la suite vérifier que la différence d'expression des protéines jonctionnelles ne dépendait pas des cellules utilisées et existait au niveau physiologique entre des bronches humaines saines et mucoviscidosiques. En collaboration avec les services de transplantation pulmonaire, dirigé par le Pr. Pison, et d'anatomie pathologique, dirigé par le Pr. Lantuejoul, du C.H.U. de Grenoble, nous avons bénéficié de biopsies de tissus bronchiques provenant de poumons de malades atteints de mucoviscidose et homozygotes pour la mutation F508del (CF ($\Delta F / \Delta F$)) et de poumons de patients sains ou souffrant de maladies pulmonaires autres que la mucoviscidose (non-CF).

Nous avons réitéré sur ces échantillons les expériences de qPCR et de western-blot.

Les résultats obtenus confirment ceux observés avec les cultures de cellules épithéliales bronchiques. En effet, la figure 17A et 17B montre que l'expression des ARNm de ZO-1 et E-cad sont plus faibles dans les bronches de malades que dans celles de personnes saines (~45% et ~58%, respectivement). La même chose a été constaté avec la protéine Occ dont le niveau d'expression atteints ~147% dans les bronches de malades par rapport aux branches saines (Fig. 17A et 17B). Pour la β -cat, son expression ne varie pas. Pour les expériences de western-blot, malgré des disparités entre les individus du même groupe (non-CF ou CF), l'ensemble des résultats montre une diminution de l'expression de ZO-1 et E-cad et une augmentation de l'expression de l'Occ dans les bronches mucoviscidosiques (Fig. 17C et 17D). Le niveau d'expression protéique de la β -cat ne diminue quant à lui que de manière non significative dans les tissus mucoviscidosiques (Fig. 17C et 17D).

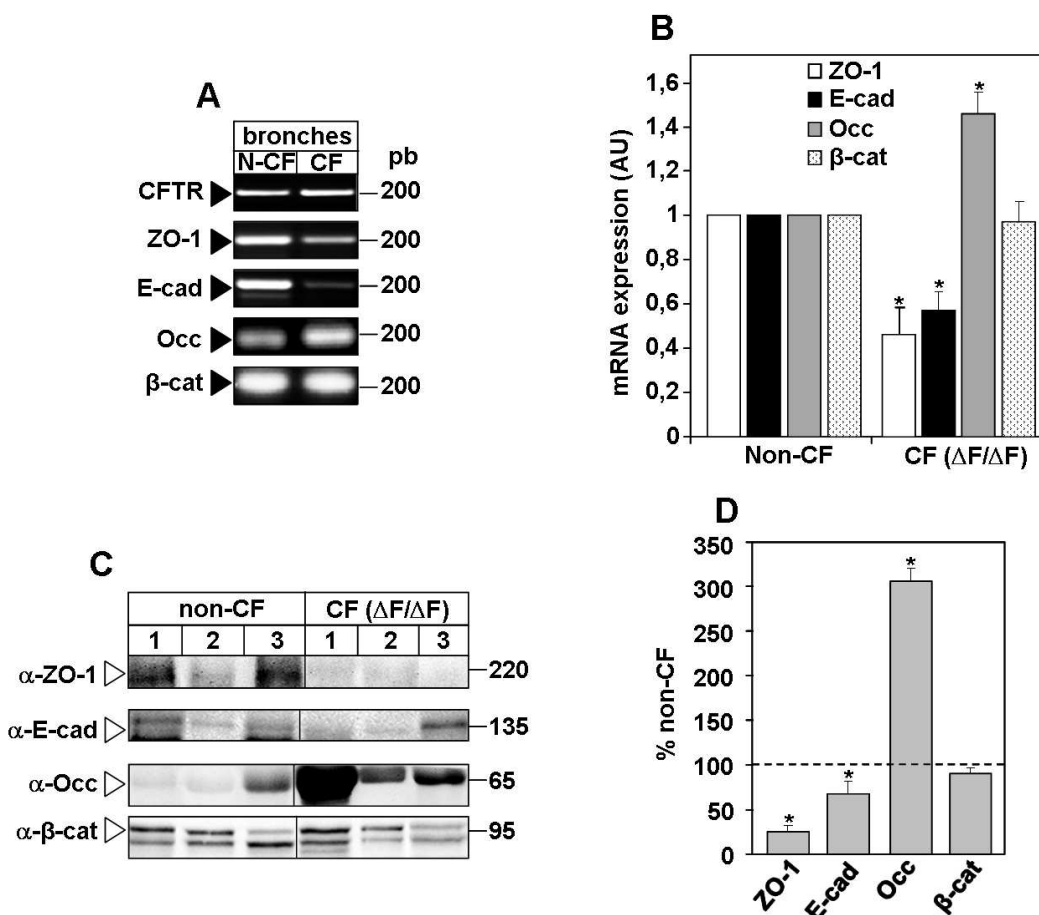


Figure 17 : Expression des protéines jonctionnelles dans des tissus bronchiques sains ou mucoviscidosiques.

A : Amplification, par 20 cycles de PCR, des ADNc issus des ARNm de tissus bronchiques sains ou mucoviscidosiques. La réaction n'a comporté que 20 cycles pour éviter d'atteindre le plateau d'amplicons. Les échantillons ont ensuite été séparés sur gel d'agarose 2% et révélés par le GelRed sous excitation UV.

B : La quantification des ARNm de ZO-1, E-cad, Occ et β-cat des tissus bronchiques sains ou mucoviscidosiques a été réalisée par PCR quantitative (qPCR). Les valeurs sont rapportées à la valeur des tissus sains. Moyenne ± S.E (n= 9).

C : Les protéines de 3 tissus bronchiques sains et 3 tissus bronchiques mucoviscidosiques ont été extraites, et 100 µg ont été déposés par puits, séparés sur gel de 7%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant les anticorps monoclonaux anti-E-cad, anti-ZO-1, anti-Occ, anti-β-cat, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

D : Quantités de ZO-1, E-cad, Occ et β-cat dans les tissus malades exprimées en pourcentage par rapport à leur expression dans les tissus sains. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne ± S.E (n= 6).

Ces résultats confirment ceux obtenus avec les lignées cellulaires et démontrent pour la première fois que la perte de la barrière luminale est la conséquence de la diminution d'expression des protéines clés des TJ (ZO-1) et AJ (E-cad) à l'échelle transcriptionnelle et protéique.

E) Les protéines ZO-1 et E-cad sont rapidement dégradées dans les cellules CFBE

La diminution du TER observée dans les cellules CFBE est la conséquence de la diminution très significative de la quantité de protéines ZO-1 et E-cad. Cette diminution s'opère à deux niveaux : transcriptionnel et protéique. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle la baisse d'expression à l'échelle protéique pourrait être le résultat de la diminution du transcrit et/ou de la dégradation rapide de ces protéines.

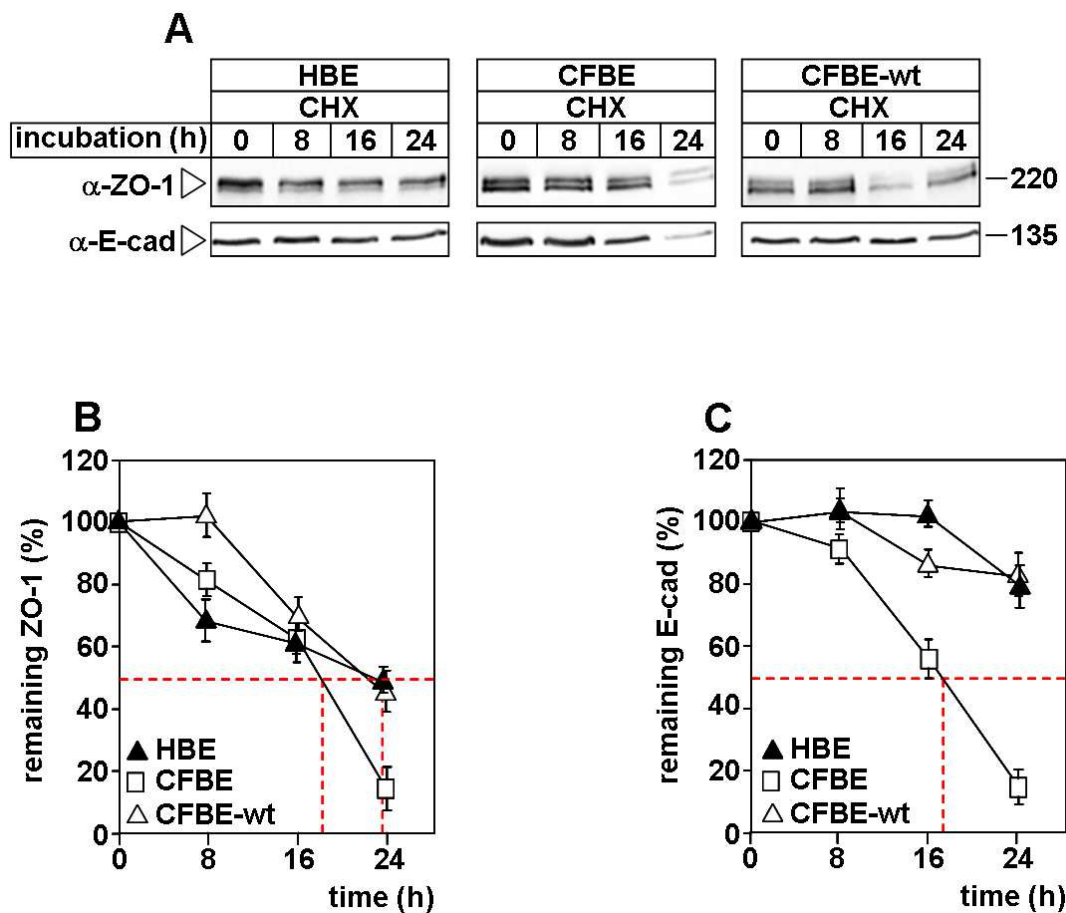


Figure 18 : Stabilité des protéines E-cad et ZO-1 dans les cellules HBE, CFBE et CFBE-wt.

A : Les cellules HBE, CFBE et CFBE-wt ont été incubées en présence de CHX (100 μ g/ml) pendant différentes périodes. 100 μ g de protéines ont été déposés par puits, séparés sur gel de 6%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant l'anti-ZO-1 ou l'anti-E-cad, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

B : Quantité de ZO-1 restante exprimée en pourcentage par rapport à son expression initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne \pm S.E (n= 4).

C : Quantité de E-cad restante exprimée en pourcentage par rapport à son expression initiale à t=0 en fonction du temps. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne \pm S.E (n= 4).

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons étudié la stabilité de ZO-1 et E-cad dans les cellules épithéliales bronchiques bien polarisées grâce à un traitement à la cycloheximide

(CHX). Les résultats montrent que la stabilité de ces deux protéines est altérée dans les cellules mucoviscidosiques, et restaurée dans les cellules corrigées par CFTR sauvage (Fig. 18). En effet, la demi-vie de ZO-1 dans les cellules HBE et CFBE-wt est de ~23h alors qu'elle n'est que de ~18h dans les cellules CFBE (Fig. 18B). La différence est encore plus flagrante pour la protéine E-cad, qui a une demi-vie supérieure à 24h dans les cellules HBE et CFBE-wt alors que celle trouvée dans les CFBE est de ~17h (Fig. 18C).

Ces résultats mettent en évidence un effet synergique de la baisse de l'expression des ARNm de ZO-1 et E-cad et de l'augmentation de leur dégradation au niveau protéique ayant pour conséquence la baisse importante de leur présence dans les cellules et tissus mucoviscidosiques. La restauration de la demi-vie par l'ajout de CFTR sauvage pose la question du mécanisme impliqué. Il pourrait s'agir d'un mécanisme physique entre CFTR et les complexes jonctionnels *via* le cytosquelette d'actine. En effet, CFTR interagit avec l'actine *via* son interaction avec le domaine PDZ de NHERF1, qui interagit avec l'Ezrine, elle-même liée à l'actine (Guggino & Stanton, 2006).

F) Implication des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$

Il est bien démontré que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ peuvent interagir avec des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires. En effet, ces protéines sont capables de se lier à l'E-cad (Meigs *et al.*, 2001) et à ZO-1 (Meyer *et al.*, 2002). Ces interactions influencent la stabilité de ZO-1 et E-cad et par conséquent modifient le comportement de la barrière luminale (Meigs *et al.*, 2001; Meigs *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données nous ont laissé penser que ces protéines G hétérotrimériques pourraient être impliquées dans le changement du TER observé dans les cellules mucoviscidosiques.

1) Implication des protéines G hétérotrimériques

Afin de vérifier si le TER peut être modulé par les protéines G hétérotrimériques y compris $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, nous avons effectué plusieurs traitements sur les cellules épithéliales bronchiques bien polarisées. Le premier traitement a consisté en une déplétion en GTP par l'acide mycophénolique (MPA) pour vérifier si les voies dépendantes des GTPases sont importantes dans l'instauration et le maintien des jonctions cellulaires. Ce traitement, ayant été appliqué pendant 3 jours sur des cellules confluentes depuis 6 jours, a réduit de ~90-95% le TER dans toutes nos lignées testées (Fig. 19A), démontrant ainsi l'implication de la

molécule de GTP, et donc des protéines G, dans les jonctions cellulaires. Pour faire la distinction entre les protéines G monomériques et hétérotrimériques, nous avons traité nos cellules avec de l' AlF_4^- , qui inhibe spécifiquement l'activité GTPasique des protéines G hétérotrimériques en mimant le phosphate γ du GTP (Li, 2003). La figure 19B montre que ce traitement augmente le TER des cellules épithéliales rénales MDCK alors que le TER des cellules épithéliales bronchiques est diminué d'une manière comparable à celle obtenue avec le MPA, ~90-95%.

Ces résultats surprenants suggèrent un mécanisme très différent entre les cellules épithéliales rénales et bronchiques en ce qui concerne l'instauration et le maintien des jonctions cellulaires. L'augmentation du TER par l' AlF_4^- dans les cellules MDCK avait déjà été mise en évidence par l'équipe de Denker (Saha *et al.*, 1998). Un mécanisme différent expliquerait également notre précédente observation concernant une instauration rapide des jonctions cellulaires dans les MDCK, et beaucoup plus lente dans les cellules épithéliales bronchiques (Fig. 14C).

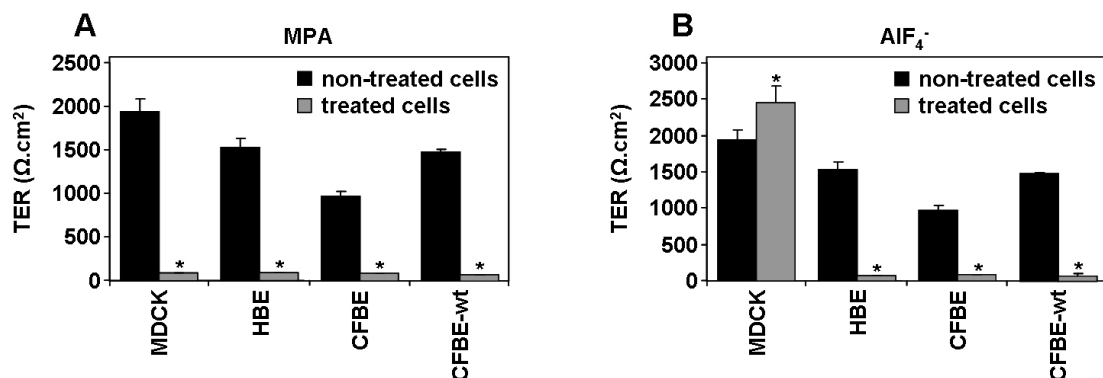


Figure 19 : Effet du MPA et de l' AlF_4^- sur le TER des cellules épithéliales.

Les cellules ayant poussées sur Transwell pendant 6 jours ont ensuite été traitées ou non pendant 3 jours avec de l'acide mycophénolique (MPA ; 50 μM ; A) ou de l' AlF_4^- (10 μM ; B). Le TER a été mesuré après les 3 jours de traitement. Moyenne \pm S.E (n= 4).

2) Diminution de l'expression de $\text{G}\alpha_{12}$ et $\text{G}\alpha_{13}$ dans les cellules et tissus mucoviscidiques

L'implication de protéines G hétérotrimériques ayant été mise en évidence, nous avons dans un premier temps cherché à savoir si l'expression des protéines $\text{G}\alpha_{12}$ et $\text{G}\alpha_{13}$, tout comme celle des protéines jonctionnelles, variait dans les cellules et les tissus mucoviscidiques. La quantification des ARNm par qPCR a permis de montrer que le niveau d'expression de $\text{G}\alpha_{12}$ et $\text{G}\alpha_{13}$ baisse d'~60% et ~50% dans les cellules et les tissus mucoviscidiques, respectivement (Fig. 20A). En revanche, contrairement aux protéines

jonctionnelles, le niveau d'expression des ARNm de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ n'est pas restauré dans les cellules CFBE-wt, mais diminue de façon encore plus importante (~80% ; Fig. 20A). Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique dans les cellules et dans les tissus bronchiques. Nous pouvons en effet observer sur la figure 20B que le niveau d'expression protéique de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ est plus faible dans les cellules CFBE que dans les cellules HBE, et est encore plus faible dans les cellules CFBE-wt. Nous n'avons pas observé de différence entre les cellules non-épithéliales mucoviscidiques IB3 et leur équivalent corrigé, les cellules S9, suggérant que ce phénomène est spécifique de l'épithélium (Fig. 20B). De la même manière, la figure 20C montre que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ sont plus exprimées dans les tissus sains que dans les tissus mucoviscidiques.

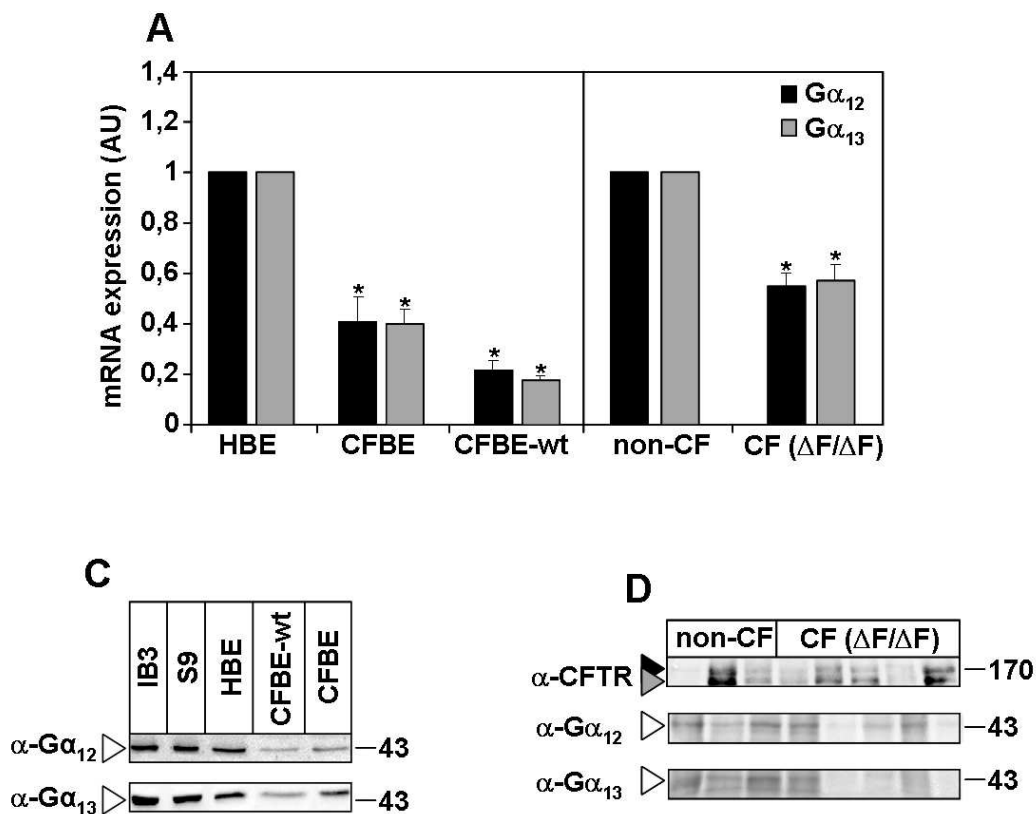


Figure 20 : Expression des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les cellules et les tissus bronchiques sains et mucoviscidiques.

A : La quantification des ARNm de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les cellules épithéliales bronchiques et dans les tissus bronchiques sains ou mucoviscidiques a été réalisée par PCR quantitative (qPCR). Les valeurs sont rapportées à la valeur des cellules saines et des tissus sains. Moyenne \pm S.E (n= 9).

B : Les protéines des cellules IB3, S9, HBE, CFBE et CFBE-wt ont été extraites, et 100 μ g ont été déposés par puits, séparés sur gel de 12%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant les anticorps anti- $G\alpha_{12}$ ou anti- $G\alpha_{13}$, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

C : Les protéines de tissus bronchiques sains et mucoviscidiques ont été extraites, et 100 μ g ont été déposés par puits, séparés sur gel de 12%, électro-transférés sur membrane de nitrocellulose et révélés par immunodétection, en utilisant les anticorps anti- $G\alpha_{12}$ ou anti- $G\alpha_{13}$, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

Cette différence a également été observée par immunohistochimie sur les échantillons de tissus humains. En effet, l'observation des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ par cette méthode a révélé une présence plus importante dans les tissus sains que dans les tissus malades (Fig. 21A). Ces résultats montrent par ailleurs la destruction du tissu épithélial dans les cas mucoviscidosiques par rapport aux tissus sains. De plus, nous avons pu constater que la localisation cellulaire de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ est plus membranaire qu'intracellulaire. Cette observation a été confirmée par des expériences de western-blot réalisées sur différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle à partir des cellules HBE et CFBE (Fig. 21B). Les résultats obtenus confirment d'abord la faible expression des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les cellules CFBE par rapport aux HBE, et montrent une présence importante de ces deux protéines dans la fraction microsomale (Mic) enrichie en réticulum endoplasmique, en membrane plasmique, en endosomes et en vésicules de sécrétion (Fig. 21B). En revanche, aucune présence n'a été détectée au niveau cytoplasmique (Cyt). Ces résultats confirment la présence membranaire des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.

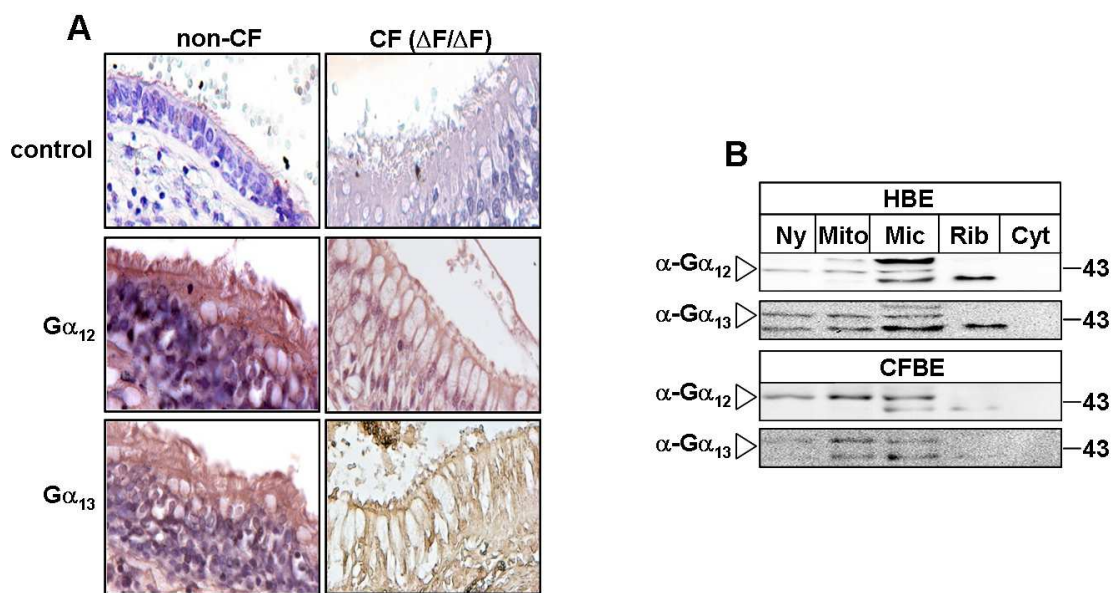


Figure 21 : Expression et localisation des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les tissus bronchiques sains et mucoviscidosiques.

A : Des coupes de tissus bronchiques humains sains ou mucoviscidosiques, exprimant de manière endogène les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, ont été immuno-marquées indirectement en utilisant l'anti- $G\alpha_{12}$ ou l'anti- $G\alpha_{13}$. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la biotine et permettant ainsi la coloration brune grâce à la fixation du complexe ABC et la présence du réactif DAB. L'utilisation des anticorps secondaires seuls est notre contrôle négatif.

B : Les cellules HBE et CFBE ont été utilisées pour réaliser des centrifugations différentielles afin de séparer les différents compartiments cellulaires (Ny = noyau ; Mito = mitochondrie ; Mic = microsomes ; Rib = ribosomes ; Cyt = cytosol). 100 μ g de protéines ont été déposées par puits, séparées sur gel de 12%, électro-transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par immunodétection, en utilisant les anticorps anti- $G\alpha_{12}$ ou anti- $G\alpha_{13}$, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et le kit ECL.

De plus, nous avons observé que ces deux protéines sont aussi exprimées au niveau nucléaire (probablement une contamination par le RE), dans les mitochondries, et dans les ribosomes (probablement le pool de protéines restant associé aux ribosomes au cours de la synthèse).

3) Interaction avec ZO-1 et E-cad dans les cellules saines

Par la suite, nous avons voulu confirmer, dans nos lignées cellulaires, les données publiées mettant en évidence l'interaction entre les protéines $G\alpha_{12/13}$ et les protéines jonctionnelles E-cad et ZO-1. Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé des expériences de colocalisation dans les cellules saines et mucoviscidosiques, puis des expériences de « Proximity Ligation Assay » (PLA) pour confirmer les interactions.

a) Colocalisation

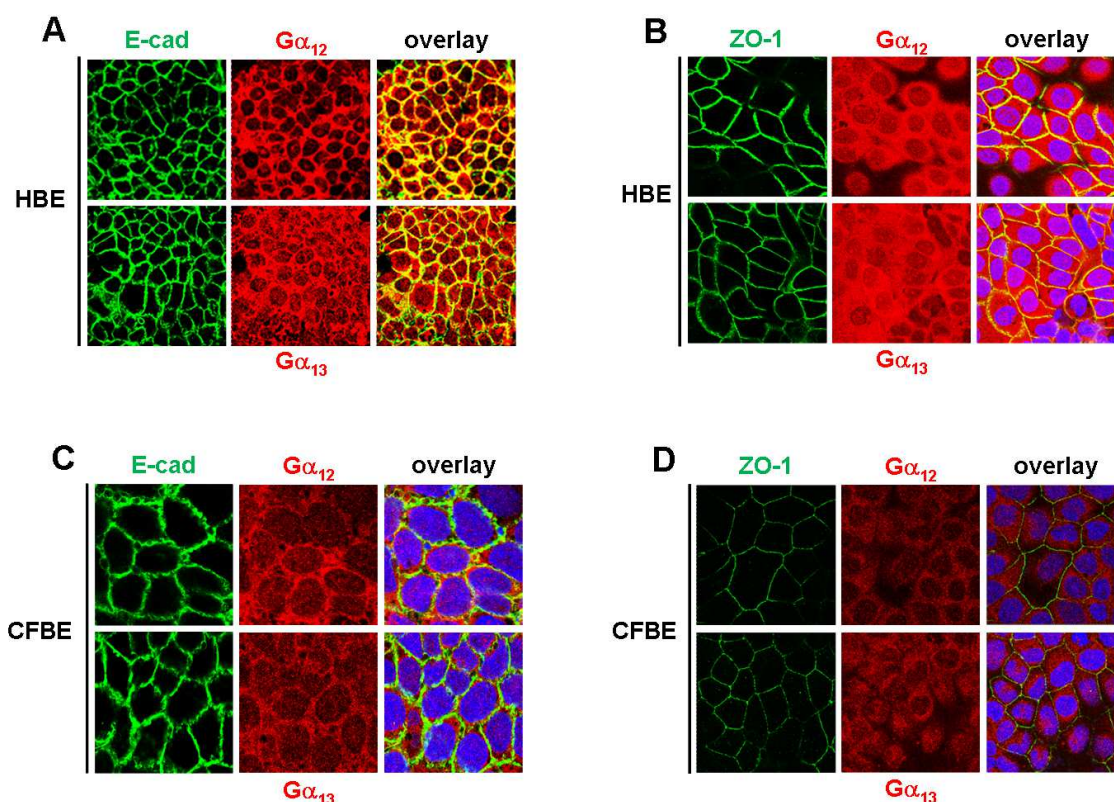


Figure 22 : Colocalisation des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec les protéines des jonctions cellulaires.

A : Les cellules HBE, exprimant de manière endogène les protéines E-cad, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-E-cad et l'anti- $G\alpha_{12}$ ou - $G\alpha_{13}$. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa488 (pour E-cad) et d'un anticorps anti-lapin couplé au TRITC (pour $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$). L'overlay représente la superposition des couleurs vertes, rouges et bleues (noyau).

B : Les cellules HBE, exprimant de manière endogène les protéines ZO-1, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-ZO-1 et l'anti- $G\alpha_{12}$ ou - $G\alpha_{13}$. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa488 (pour ZO-1) et

d'un anticorps anti-lapin couplé au TRITC (pour $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$). L'overlay représente la superposition des couleurs vertes, rouges et bleues (noyau).

C : Les cellules CFBE, exprimant de manière endogène les protéines E-cad, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-E-cad et l'anti- $G\alpha_{12}$ ou - $G\alpha_{13}$. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa488 (pour E-cad) et d'un anticorps anti-lapin couplé au TRITC (pour $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$). L'overlay représente la superposition des couleurs vertes, rouges et bleues (noyau).

D : Les cellules CFBE, exprimant de manière endogène les protéines ZO-1, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, ont été fixées, perméabilisées et marquées indirectement en utilisant l'anti-ZO-1 et l'anti- $G\alpha_{12}$ ou - $G\alpha_{13}$. La révélation de ces anticorps a été obtenue par l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa488 (pour ZO-1) et d'un anticorps anti-lapin couplé au TRITC (pour $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$). L'overlay représente la superposition des couleurs vertes, rouges et bleues (noyau).

Les images ont été acquises avec un microscope confocal TCS SP2 (*Leica*) à l'aide d'un objectif 63x et du logiciel Leica confocal software. La colocalisation a également été effectuée grâce au logiciel Leica confocal software.

Grâce aux expériences de colocalisation réalisées sur les cellules HBE et CFBE, nous avons démontré que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ colocalisent de manière importante avec les protéines E-cad et ZO-1 dans les cellules HBE (Fig. 22A et 22B) alors que cette colocalisation est quasi-inexistante dans les cellules CFBE (Fig. 22C et 22D). Ces résultats confirment également les précédents en montrant une expression moins importante des protéines $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, E-cad et ZO-1 dans les cellules CFBE par rapport aux cellules HBE (Fig. 22).

b) Interaction

Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ colocalisant avec E-cad et ZO-1 dans nos lignées cellulaires, nous avons voulu étudier leurs interactions grâce à la méthode PLA, permettant de visualiser des interactions protéiques par microscopie.

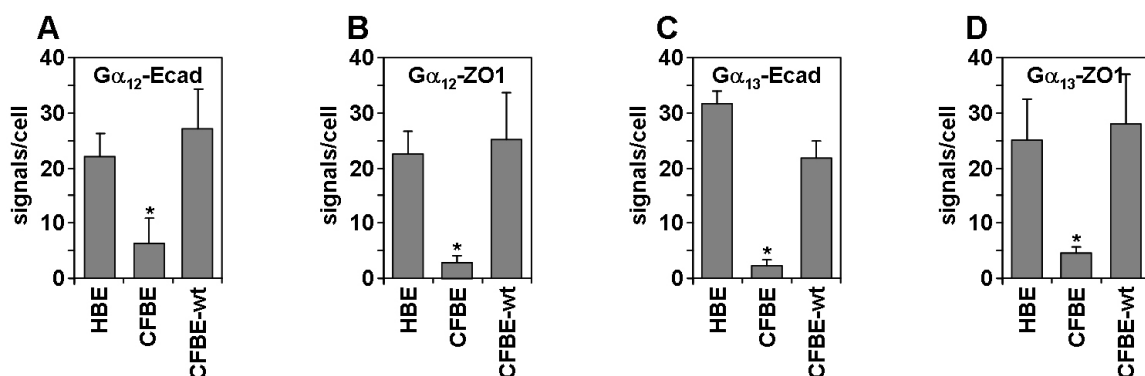


Figure 23 : Interaction des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec les protéines jonctionnelles E-cad et ZO-1.

Quantification du nombre de signaux par cellule obtenu par PLA pour les interactions entre les protéines $G\alpha_{12}$ et E-cad (A), $G\alpha_{12}$ et ZO-1 (B), $G\alpha_{13}$ et E-cad (C) et $G\alpha_{13}$ et ZO-1 (D). Les images ont été acquises avec un microscope confocal TCS SP2 (*Leica*) à l'aide d'un objectif 63x et du logiciel Leica confocal software. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne \pm S.E (n= 5).

Les résultats montrent que $G\alpha_{12}$ et E-cad interagissent, et que cette interaction est moins importante dans les cellules CFBE que dans les cellules HBE et CFBE-wt (Fig. 23A). De même, la protéine $G\alpha_{12}$ interagit moins avec ZO-1 dans les cellules malades que dans les cellules saines ou les cellules corrigées (Fig. 23B). Des résultats très comparables ont été obtenus en ce qui concerne les interactions entre $G\alpha_{13}$ et E-cad et entre $G\alpha_{13}$ et ZO-1 (Fig. 23C et 23D). Ces résultats suggèrent donc que la baisse du TER dans les cellules mucoviscidose pourrait non seulement être due à une diminution de l'expression de protéines jonctionnelles, mais également à une diminution de l'interaction entre ces protéines et les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$.

G) La diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ diminue la migration des cellules CFBE-wt

En 2002, Meigs et collaborateurs ont démontré que $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, en se liant à E-cad, pouvaient induire le relargage de la β -cat, qui elle-même est liée aux filaments d'actine (Meigs *et al.*, 2002). Ceci a pour conséquence de bloquer la migration cellulaire. Il était donc raisonnable de penser qu'une baisse de l'expression de $G\alpha_{12/13}$ et de l'E-cad conduise à une diminution de ce phénomène, et donc à une migration cellulaire moins efficace. Pour cela, nous avons effectué le test de la blessure sur des monocouches de cellules épithéliales rénales et bronchiques (Fig. 24).

Les résultats indiquent que les cellules rénales, ainsi que les cellules bronchiques saines ou corrigées, ont une migration permettant la fermeture de la blessure en ~24h (Fig. 24). En revanche, les cellules CFBE ne referment que ~75% de la blessure en 24h (Fig. 24). Ceci démontre que la diminution d'expression de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les cellules mucoviscidose a bien un impact sur les protéines jonctionnelles, et que cet impact n'agit pas uniquement sur la fonction de barrière épithéliale, mais également sur d'autres fonctions cellulaires comme la migration.

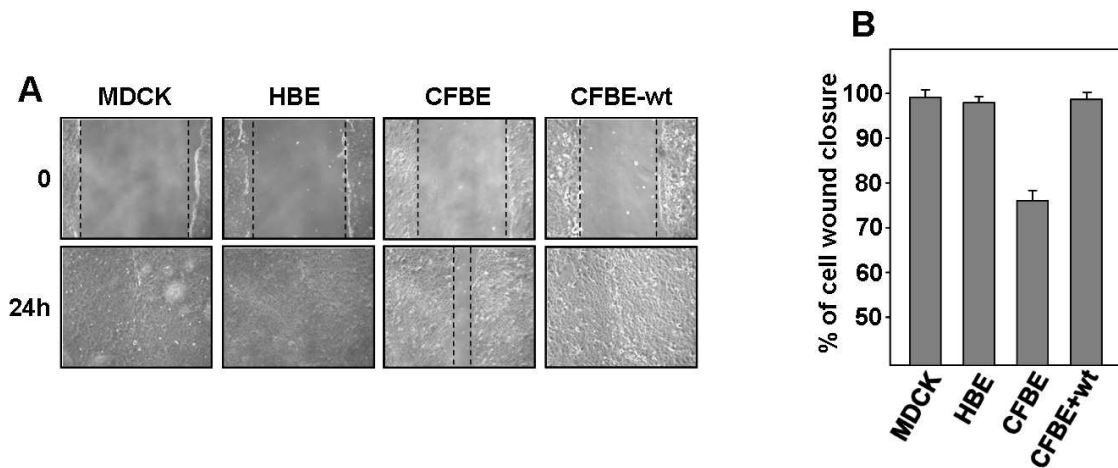


Figure 24 : Test de la blessure sur les cellules épithéliales rénales et bronchiques.

A : Les cellules MDCK, HBE, CFBE et CFBE-wt ont été cultivées en boîtes de 6 cm jusqu'à atteindre la confluence. Les cellules ont ensuite été raclées avec un cône stérile pour créer une blessure artificielle. Les images ont été prises tout de suite après la blessure et 24h plus tard.

B : Quantification de la fermeture de la blessure après 24h. La taille de la blessure a été mesurée sur les photographies à l'aide du logiciel Image J. Les résultats sont présentés en pourcentage de fermeture après 24h par rapport à t=0. Moyenne \pm S.E (n= 4).

H) Une diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ diminue le TER et favorise l'invasion de l'épithélium bronchique par *P. aeruginosa*

A) Réduction du TER par une diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$

Afin de nous assurer que les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ étaient bien impliquées dans le contrôle des jonctions cellulaires, nous avons entrepris de diminuer leur expression par ARN interférents (siRNA) dans les cellules épithéliales bronchiques saines et étudier l'effet de cette diminution sur le TER de la monocouche cellulaire.

La figure 25A démontre qu'une diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ réduit de manière importante le TER de la monocouche de cellules HBE alors que la diminution de l'expression de $G\alpha_{13}$ n'a pas d'effet significatif. Il est de plus intéressant de noter que le TER des cellules traitées avec le siRNA dirigé contre $G\alpha_{12}$ est comparable à celui des cellules CFBE en condition normale ($\sim 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$, voir Fig. 14D et 14E). Ceci suggère que c'est la diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ dans les cellules CFBE qui conduirait à la diminution du TER.

B) Test d'invasion épithéliale par *P. aeruginosa*

Avant la réalisation de ce test, nous avons, dans un premier temps, voulu vérifier que la diminution d'expression de la protéine $G\alpha_{12/13}$ par siRNA pourrait réduire le TER. Pour cela, l'expression des protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ a été diminuée par siRNA dans les cellules HBE ayant poussé sur filtre Transwell pendant 9 jours. Les résultats indiqués sur la figure 25A montrent que le TER diminue de ~40% uniquement en présence de siRNA $G\alpha_{12}$. Le niveau de TER atteint en présence de siRNA $G\alpha_{12}$ est comparable à celui mesuré dans les cellules CFBE. Ces résultats démontrent que seule la protéine $G\alpha_{12}$ est impliquée dans le contrôle des jonctions au niveau des cellules épithéliales pulmonaires.

Pour appuyer ce résultat, nous avons pratiqué le test de l'invasion épithéliale par *P. aeruginosa*. En effet, il a été montré qu'une diminution de la résistance transépithéliale liée à un affaiblissement des jonctions cellulaires facilite l'invasion de l'épithélium pulmonaire par ce pathogène (Lee *et al.*, 1999a). Nous avons donc voulu vérifier si la réduction du TER due à une diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ pouvait favoriser l'infection d'une monocouche de cellules épithéliales bronchiques par des bactéries fluorescentes *Pseudomonas aeruginosa*. Pour cela, nous avons diminué l'expression des protéines $G\alpha_{12}$ ou $G\alpha_{13}$ par siRNA dans les cellules HBE, CFBE et CFBE-wt ayant poussé sur filtre Transwell pendant 9 jours. Après 2 jours de traitement avec les siRNA, les cellules ont été infectées avec des bactéries *P. aeruginosa* exprimant constitutivement la protéine fluorescente GFP. Un MOI (Multiplicity Of Infection) de 10 a été utilisé, c'est-à-dire que l'infection a mis en jeu 10 fois plus de bactéries que de cellules. Après 4h d'infection, la quantité de bactéries ayant pénétré la monocouche de cellule a pu être déterminée par microscopie (exemple Fig. 25B). Les résultats démontrent qu'une diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ favorise l'invasion bactérienne dans les cellules HBE et CFBE (Fig. 25C et 25D). En effet, l'invasion a été multipliée par ~4,5 dans les cellules HBE et par ~1,9 dans les cellules CFBE (Fig. 25C et 25D). En revanche, ce traitement n'a pas eu d'effet significatif sur l'invasion des cellules CFBE-wt, conduisant à penser que le mécanisme de restauration du TER, et donc de la résistance à l'invasion bactérienne, par l'apport de CFTR sauvage est indépendant de $G\alpha_{12}$. Le traitement par siRNA dirigés contre l'ARNm de $G\alpha_{13}$ n'a quant à lui eu aucun effet notable sur l'invasion bactérienne des monocouches de cellules épithéliales, écartant la protéine $G\alpha_{13}$ du mécanisme de perte du TER et de défense contre l'invasion bactérienne dans la mucoviscidose (Fig. 25C, 25D et 25E).

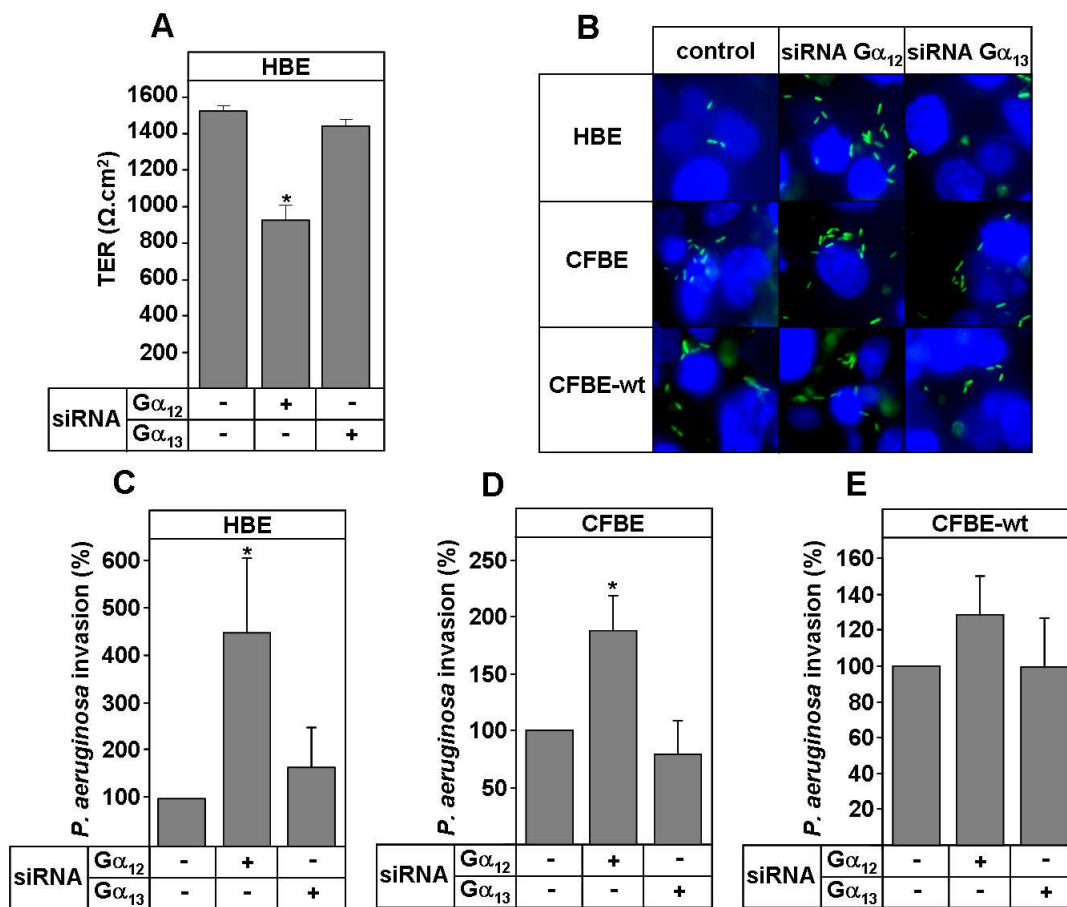


Figure 25 : Effet de la diminution d'expression de Gα₁₂ ou Gα₁₃ sur le TER et la résistance à l'invasion par *P. aeruginosa*.

A : Les cellules HBE ayant poussées pendant 9 jours sur Transwell ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre les ARNm de Gα₁₂ ou de Gα₁₃. Le TER des cellules a été mesuré après 2 jours de traitement par siRNA. Moyenne ± S.E (n= 3).

B : Les cellules HBE, CFBE et CFBE-wt ayant poussées pendant 9 jours sur Transwell ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre les ARNm de Gα₁₂ ou de Gα₁₃. Après deux jours de traitement par siRNA, les cellules ont été infectées par des bactéries *P. aeruginosa* exprimant constitutivement la protéine fluorescente GFP. Après 4h d'infection à 37°C, les bactéries n'ayant pas pénétré la monocouche de cellules ont été éliminées par 20 min de lavage avec du milieu de culture MEM + 10% SVF contenant de la gentamycine (300 µg/ml). Les filtres ont ensuite été découpés, fixés, marqués au DAPI, et visualisés avec un microscope confocal TCS SP2 (*Leica*) à l'aide d'un objectif 63x et du logiciel Leica confocal software. La colocalisation a également été effectuée grâce au logiciel Leica confocal software.

C, D et E : Quantification du nombre de bactéries par cellules dans les lignées HBE (**C**), CFBE (**D**) et CFBE-wt (**E**). Les images ont été acquises avec un microscope confocal TCS SP2 (*Leica*) à l'aide d'un objectif 63x et du logiciel Leica confocal software. La quantification a été obtenue par le programme Image J. Moyenne ± S.E (n= 6).

Discussion

Conclusions

I) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de la protéine CFTR mutée

Avant de quitter le RE, les protéines nouvellement synthétisées doivent atteindre leur conformation native. Les mécanismes de contrôle de qualité associés au RE (ERQC) 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 appelée ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation) (Bonifacino & Weissman, 1998; Brodsky & McCracken, 1999). Cette voie de dégradation implique la reconnaissance, la translocation, puis la protéolyse des protéines défectueuses par le protéasome, complexe enzymatique multicatalytique, localisé au niveau du cytoplasme (Brodsky & McCracken, 1999).

C'est en 1995 que la protéine CFTR-F508del a été parmi les premières protéines incorrectement repliées pour lesquelles le protéasome a été impliqué (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995). Au niveau du RE, la dégradation de CFTR-F508del nécessite son interaction avec des protéines chaperonnes, son 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 (Jensen *et al.*, 1995; Ward *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; Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995).

Cependant, la nature des protéases impliquées dans la dégradation de CFTR-F508del, ainsi que le lieu de leur action, restent inconnus.

Malgré la mutation F508, la protéine CFTR-F508del garde 60% de son activité canal Cl^- qui peut s'exprimer au niveau de la membrane apicale si son adressage intracellulaire est corrigé (Cheng *et al.*, 1990; Dalemans *et al.*, 1991; Drumm *et al.*, 1991; Lukacs *et al.*, 1993; Welsh & Smith, 1993; Haws *et al.*, 1996). Ce constat a constitué, et continue à constituer, un espoir thérapeutique pour la mucoviscidose où 70% des malades sont porteurs de cette mutation. De plus, il a été montré que la surexpression au niveau réticulaire de CFTR-F508del fait apparaître un courant Cl^- activé par l'ATP et l'AMPC, suggérant qu'une inhibition de la dégradation de CFTR mutée au niveau du RE permettrait son accumulation et donc son trafic vers la membrane apicale (Mohammad-Panah *et al.*, 1998).

Il est ainsi très important de bien caractériser la dégradation de cette protéine pour pouvoir augmenter son expression à la membrane plasmique, et espérer corriger le défaut de sécrétions des ions Cl⁻.

Récemment, nous avons montré que le GTP est très important, plus que l'ATP, dans l'élimination de CFTR mutée (De Keukeleire *et al.*, 2008). Nous avons caractérisé à l'échelle moléculaire, biochimique et cellulaire cette voie de dégradation dépendante du GTP (De Keukeleire *et al.*, 2008), et avons montré que deux GTPases de la famille des protéines G hétérotrimériques, G α_{12} et G α_{13} , seraient impliquées directement ou indirectement dans cette voie.

Nous avons approfondi ce travail de caractérisation au cours de cette étude. Plus précisément, nous avons montré que la protéine G α_{12} en association avec les chaperonnes CNX et HSP90 serait impliquée dans la dégradation de la protéine CFTR-F508del.

CNX et HSP90 sont deux protéines impliquées dans deux processus différents au cours de la vie réticulaire d'une protéine nouvellement synthétisée.

Dans notre étude, nous avons utilisé la ligné BHK-21 stablement transfectée par la protéine CFTR-F508del étiquetées HA. En effet, devant la faible spécificité des anticorps anti-CFTR, même monoclonaux, l'étiquette HA a énormément facilité sa détection, soit à l'échelle cellulaire (immunofluorescence), soit au niveau d'extraits protéiques (immunodétection). L'expression de CFTR dans ces lignées a déjà bien été caractérisée et 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 ou sa fonction canal chlorure (Cl⁻) (en cours de rédaction).

Pour éviter les conséquences d'une surexpression protéiques sur différents mécanismes cellulaires, nos études ont été réalisées sur un nouveau clone de cellules BHK-21 exprimant stablement la protéine CFTR-F508del-HA, et dont le niveau d'expression est comparable à celui détecté dans les cellules épithéliales bronchiques mucoviscidiques (en cours de rédaction). Sur ce modèle cellulaire, comme sur celui des cellules épithéliales bronchiques humaines saines (HBE) et mucoviscidiques (CFBE) (Crawford *et al.*, 1991; Denning *et al.*, 1992b), nous avons confirmé les résultats publiés précédemment par notre groupe en montrant que l'inhibition des protéines G hétérotrimériques, par l'AlF₄⁻, ou la déplétion en GTP, par le MPA, ralentit la dégradation de CFTR mutée en augmentant sa demi-vie.

Grâce aux techniques de centrifugation différentielle et de « décapage » au Na₂CO₃, nous avons pu déterminer que la (les) les protéine(s) impliquée(s) dans la voie de dégradation

dépendante du GTP est (sont) associée(s) à la membrane périphérique des microsomes enrichis en RE. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse des protéines de ces microsomes ainsi que le blocage par des anticorps anti-G α_{12} et anti-G α_{13} a permis d'identifier ces dernières comme jouant un rôle dans cette voie de dégradation GTP-dépendante. Notre étude démontre également pour la première fois, par immunofluorescence et fractionnement subcellulaire sur gradient de sucrose, que les protéines G α_{12} et G α_{13} sont majoritairement exprimées au niveau du RE, et qu'elles colocalisent avec les protéines CFTR sauvages et mutées, ainsi qu'avec la CNX et HSP90 dans ce compartiment.

Bien qu'aucune interaction directe entre les protéines G $\alpha_{12/13}$ et CFTR sauvages ou mutées n'ait pas pu être mise en évidence, nous avons démontré par deux techniques, à savoir l'immunoprécipitation et le « Proximity Ligation Assay », que la protéine G α_{12} , et non G α_{13} , interagit avec les mêmes protéines chaperonnes que la forme immature du CFTR : HSP90 et CNX. L'interaction G α_{12} avec la HSP90 a été déjà rapportée (Vaiskunaite *et al.*, 2001). Pour la CNX, c'est la première fois que son interaction avec G α_{12} est identifiée. Cependant les rôles de ces interactions dans la dégradation des protéines mal repliées et retenues dans le RE, comme CFTR-F508del, restaient à explorer.

Il est bien démontré que les chaperonnes CNX et HSP90 interagissent uniquement avec la forme immature de CFTR sauvage et mutée (Pind *et al.*, 1994; Loo *et al.*, 1998).

L'interaction avec la CNX empêche la fraction mal repliées de CFTR sauvage (70%) et mutée (100%) de s'agréger jusqu'à sa livraison au complexe protéique responsable de la dégradation (Pind *et al.*, 1994). HSP90, par contre, en se liant à la forme immature de CFTR sauvage ou mutée mal repliée facilitera le recrutement d'un complexe de chaperonnes qui par l'ubiquitinylation des protéines substrats va entraîner leur dégradation via le protéasome (Nikolay *et al.*, 2004).

Dans notre étude, la stabilité de ces deux chaperonnes est affectée par l' AlF_4^- et par la déplétion en GTP, alors que ce traitement n'influence pas la stabilité de G α_{12} . Par contre l'inhibition de HSP90 par GA déstabilise G α_{12} de manière importante, confirmant l'interaction HSP90-G α_{12} et montrant que les effets de ces deux chaperonnes passent par cette protéine. Ces résultats montrent que l'action de G α_{12} s'exercerait probablement à deux niveaux : le contrôle de repliement *via* la CNX, et la dégradation *via* HSP90.

Nos hypothèses ont été confirmées par l'augmentation de la stabilité CFTR-F508del après surexpression transitoire ou stable de la forme sauvage ou la forme mutée hyperactive

de $G\alpha_{12}$ ($G\alpha_{12}QL$), et par la stabilisation du complexe CFTR-F508del-chaperonnes après inhibitions de $G\alpha_{12}$ par l' AIF_4^- et par le MPA.

C'est la première fois que l'on démontre que l'expression réticulaire de CFTR-F508del est stabilisée par association prolongée avec la CNX et HSP90.

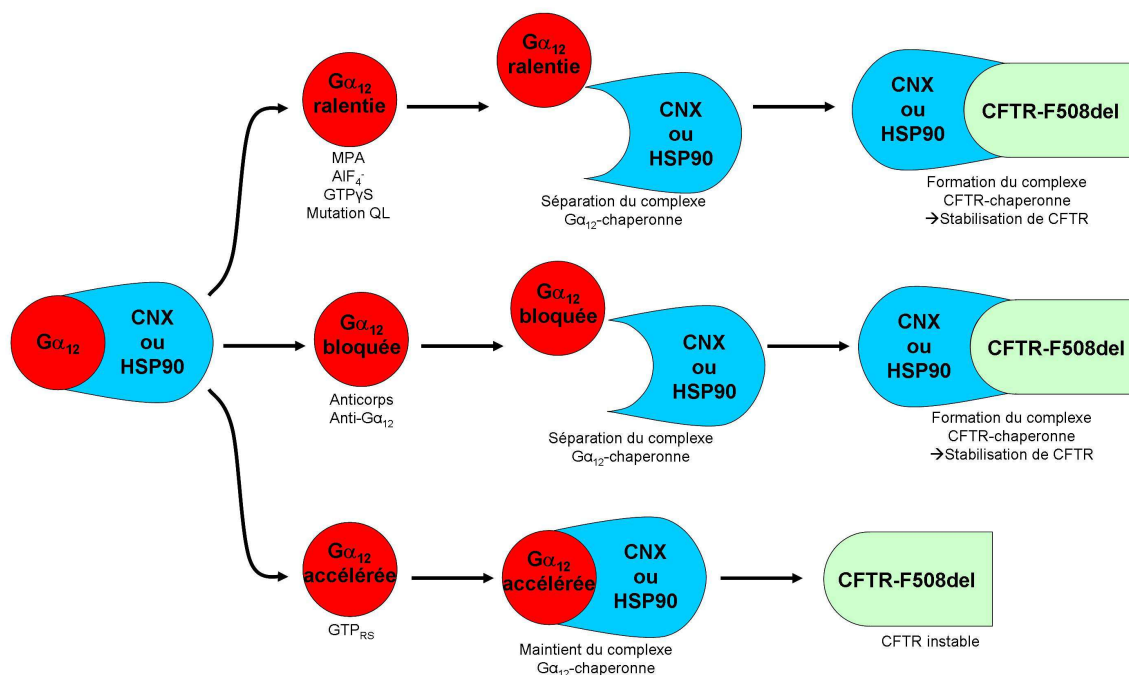


Figure D1 : Mécanisme possible de l'action de $G\alpha_{12}$ sur la stabilité de CFTR-F508del.

De plus, d'autres travaux révèlent que la biosynthèse de CFTR n'est pas altérée par des défauts de glycosylation (Loo & Clarke, 1998), hypothèse corroborée par l'étude démontrant la présence d'une cinétique de dégradation de CFTR sauvage identique dans des levures déficientes ou non en CNX (Meacham *et al.*, 2001). L'interaction physique entre la CNX et la forme immature de CFTR sauvage et mutée est confirmée, comme l'avais déjà démontré plusieurs études (Yang *et al.*, 1993; Pind *et al.*, 1994; Loo *et al.*, 1998; Meacham *et al.*, 1999; Norez *et al.*, 2008). Cependant, le rôle de cette interaction reste assez controversé (Pind *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1995; Farinha & Amaral, 2005; Okiyonedo *et al.*, 2008). Nos résultats montrant que la CNX interagit avec $G\alpha_{12}$, et que la déplétion en GTP ainsi que le traitement par l' AIF_4^- stabilise la CNX et son interaction avec CFTR-F508del, indiquent clairement que l'on peut moduler indirectement l'effet de la CNX sur la vie de CFTR-F508del.

Ainsi, l'effet de la déplétion en GTP sur la dégradation de CFTR-F508del au niveau du RE serait la conséquence d'une inactivation de la protéine $G\alpha_{12}$ et de sa dissociation avec

HSP-90 et CNX, qui seraient alors plus disponibles pour interagir avec CFTR mutée et la stabiliser.

L'ensemble de cette étude nous a conduits à proposer un mécanisme par lequel la protéine $G\alpha_{12}$ pourrait contrôler la stabilité de CFTR (Fig. D1).

Selon nos résultats, une protéine $G\alpha_{12}$ bloquée (par anticorps) ou dont le cycle se verrait ralentir par un manque de GTP disponible (MPA), l'impossibilité d'hydrolyser son substrat (AlF_4^- ou $GTP\gamma S$), ou un ralentissement de l'échange $GTP_{hydrolysé} \rightarrow GDP$ (mutation QL (Masters *et al.*, 1989)), entrainerait la séparation du complexe $G\alpha_{12}$ -chaperonne. Les chaperonnes ainsi libérées pourrait alors interagir avec CFTR et la stabiliser. *A contrario*, une protéine $G\alpha_{12}$ dont le cycle serait accéléré par un apport important en GTP (GTP_{RS}) resterait liée à sa chaperonne, qui serait donc incapable d'aller interagir avec CFTR mutée.

II) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans le contrôle des jonctions intercellulaires : cas de la mucoviscidose

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de l'effondrement de la barrière épithéliale, parmi lesquels on trouve aujourd'hui deux protéines GTPasiques de la famille des protéines G hétérotrimériques : $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$. Leur rôle dans le développement et le maintien du complexe jonctionnel au niveau des cellules rénales (MDCK) a bien été étudié (Meyer *et al.*, 2003; Donato *et al.*, 2009). Cependant rien n'est connu de leurs implications dans les jonctions de l'épithélium pulmonaire.

Bien qu'une étude ait montré que le fait de corriger des cellules mucoviscidosiques par l'apport du gène CFTR sauvage diminuait la résistance transépithéliale de ces cellules (Nilsson *et al.*, 2010), deux études plus récentes ont obtenu des résultats inverses et ont mis en évidence une autre caractéristique de la mucoviscidose à l'échelle cellulaire : la diminution de la résistance transépithéliale (LeSimple *et al.*, 2010; Weiser *et al.*, 2011). Cette diminution serait responsable de la surinfection pulmonaire par des bactéries pathogènes opportunistes comme *Pseudomonas aeruginosa* (Lee *et al.*, 1999a). En effet, cette surinfection pulmonaire est la cause la plus fréquente de la mortalité observée dans la mucoviscidose. Ces bactéries induisent la production de facteurs pro-inflammatoires par les cellules épithéliales bronchiques (Khair *et al.*, 1996), ce qui mène à la destruction du tissu pulmonaire. Des études ont montré que les bactéries *P. aeruginosa* entrent dans les cellules par la membrane basolatérale (Ramphal *et al.*, 1981; Sheth *et al.*, 1994). Ces bactéries doivent donc se frayer un chemin au travers des jonctions cellulaires avant de pouvoir infecter les cellules. L'équipe de Mostov a démontré qu'une baisse de la résistance transépithéliale (TER) de l'épithélium facilitait l'infection par *P. aeruginosa* et avancé l'hypothèse selon laquelle la polarité des cellules épithéliales constituerait une première défense (Fleiszig *et al.*, 1997). Ces données ont par la suite été confirmées par Lee et collaborateurs qui ont également montré qu'une diminution du TER facilitait l'invasion bactérienne, et qu'une augmentation du TER retardait la cytotoxicité due aux bactéries *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 1999a).

Ces données nous ont conduit à étudier les rôles des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans les complexes jonctionnels pulmonaires sains et mucoviscidosiques. Pour cela, nous avons utilisé les cellules saines HBE, les cellules malades CFBE, et les cellules malades corrigées CFBE-wt. Nous avons également validé nos résultats sur des échantillons de bronches humaines saines et mucoviscidosiques collectées au C.H.U. de Grenoble. Nos résultats

montrent que les cellules mucoviscidosiques ont un TER plus faible que les cellules saines, et que la correction par l'apport de CFTR sauvage permet la restauration du TER. Ces données sont en accord avec celles publiées récemment par l'équipe de Hanrahan, qui montrent que la présence de CFTR à la membrane, même sans activité canal Cl^- , est importante pour l'instauration d'une résistance transépithéliale (LeSimple *et al.*, 2010). Nous avons par la suite démontré que les protéines des jonctions serrées (Occludine et ZO-1) et des jonction adhérentes (E-cadhérine et β -caténine) avaient une organisation altérée dans les cellules CFBE, mais pas dans les cellules saines HBE, ou corrigées CFBE-wt. Les cellules mucoviscidosiques présentaient également un stress au niveau du cytosquelette d'actine.

Nos différentes études ont montré que la désorganisation des complexes jonctionnels, le stress des fibres d'actine, et la perte du TER sont la conséquence d'une diminution d'expression de l'E-cad et ZO-1 au niveau traductionnel et protéique dans les cellules CFBE par rapport aux HBE, et dans les échantillons de tissus humains malades.

Cette étude nous a également permis de mettre en évidence l'importance du GTP dans l'instauration et le maintien des jonctions cellulaires dans les cellules épithéliales rénales et bronchiques. De plus, nous avons pu souligner une différence de mécanisme entre les cellules rénales et bronchiques. En effet, l'inhibition des voies dépendantes des protéines G hétérotrimériques induit une augmentation du TER dans les cellules rénales alors qu'elle diminue drastiquement cette résistance dans les cellules bronchiques. Cette différence entre cellules rénales et bronchiques a également été appuyée par le fait que les jonctions cellulaires se mettent en place rapidement dans les cellules MDCK et lentement dans les cellules bronchiques.

L'implication des protéines $\text{G}\alpha_{12}$ et $\text{G}\alpha_{13}$ dans la mucoviscidose a été confirmée par la diminution de leur niveau d'expression (ARNm et protéine) dans les cellules et les bronches mucoviscidosiques. Cette diminution, contrairement aux protéines E-cad et ZO-1, n'est pas corrigée par l'expression de CFTR sauvage dans les cellules CFBE.

Quant au rôle des protéines $\text{G}\alpha_{12}/\text{G}\alpha_{13}$ dans le TER bronchique, il a été démontré par colocalisation et interaction de ces deux GTPases avec les protéines E-cad/ZO-1 au niveau des cellules HBE, et à moindre mesure dans les cellules malades CFBE.

L'interaction physique entre ces protéines confirme les résultats obtenus au niveau rénal (Meigs *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002) et suggère que la diminution de $\text{G}\alpha_{12}$ et $\text{G}\alpha_{13}$ serait derrière l'instabilité de E-cad et ZO-1 et donc de la désorganisation du réseau de

F-actine. La perturbation de la migration des cellules mucoviscidrosiques confirme cette hypothèse.

L'apport de CFTR sauvage dans les cellules CFBE a permis de restaurer le niveau d'expression normal de E-cad et de ZO-1, et par conséquent de corriger le TER, toujours en présence d'une importante diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$. Ce résultat pourrait être la conséquence d'un mécanisme physique entre CFTR et les complexes jonctionnels ne dépendant pas entièrement des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, par exemple *via* le cytosquelette d'actine. En effet, CFTR interagit avec l'actine *via* son interaction avec le domaine PDZ de NHERF1, qui interagit avec l'Ezrine, elle-même liée à l'actine (Guggino & Stanton, 2006). Enfin, nous avons démontré qu'une diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ et non de $G\alpha_{13}$, réduit le TER des cellules HBE jusqu'à atteindre un niveau comparable à celui des cellules CFBE. Cette diminution d'expression, par le biais de la baisse du TER, facilite l'invasion de l'épithélium par les bactéries pathogènes *P. aeruginosa* dans les cellules HBE et CFBE, mais pas dans les cellules CFBE-wt. Ces derniers résultats sont conformes à ceux déjà publiés sur le rôle de TER dans l'infection de l'épithélium pulmonaire par *P. aeruginosa*.

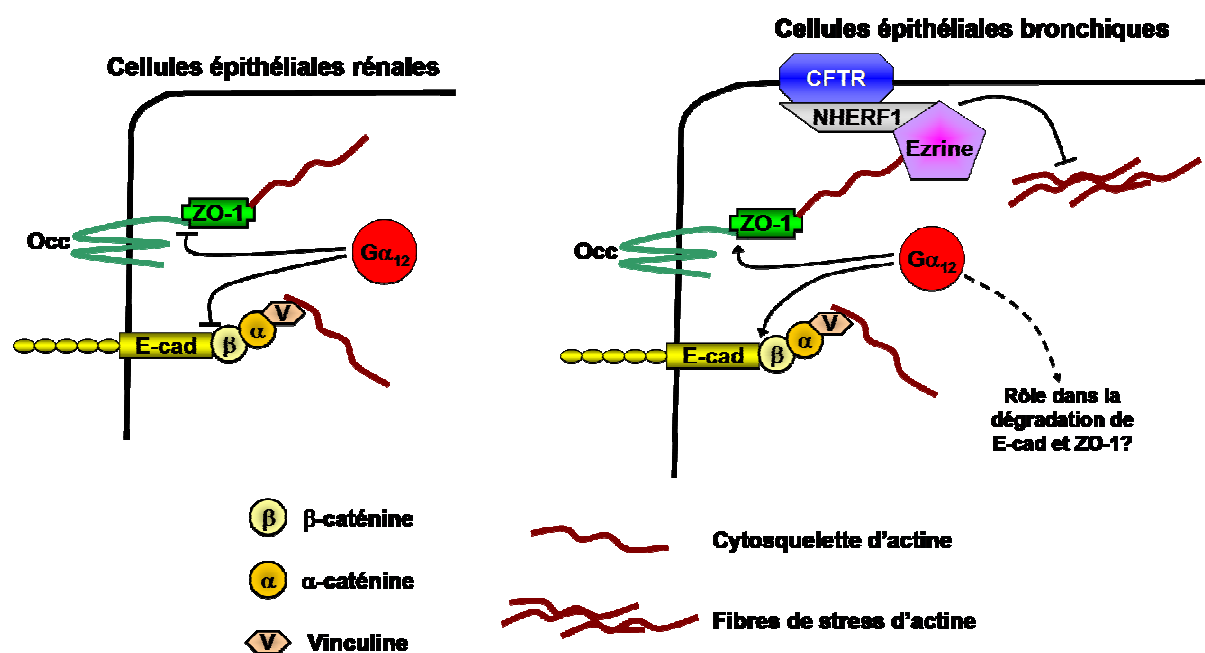


Figure D2 : Mécanisme de contrôle des jonctions cellulaires par $G\alpha_{12}$ dans les cellules épithéliales rénales et bronchiques.

En conclusion, nous avons démontré l'implication de la protéine $G\alpha_{12}$ dans l'instauration et le maintien des jonctions cellulaires dans les cellules épithéliales bronchiques. Nos résultats montrent pour la première fois que la baisse du TER, responsable

de la surinfection bactérienne des cellules mucoviscidosiques, serait due à la baisse d'expression de $G\alpha_{12}$. Nous avons également mis en évidence des différences de régulation des jonctions cellulaires entre les cellules rénales et bronchiques (Fig. D2) et démontré que la correction du TER par l'apport de CFTR sauvage dans les cellules mucoviscidosiques était indépendant de la voie $G\alpha_{12}$.

Perspectives

I) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la dégradation de la protéine CFTR mutée

La première étape pour compléter ces travaux sur le rôle de $G\alpha_{12}$ dans le contrôle de la dégradation de la protéine CFTR-F508del serait d'étudier l'effet de l'inhibition de l'interaction entre $G\alpha_{12}$ et les chaperonnes.

Cette inhibition pourrait être directe, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine (2P2I). Il a en effet été démontré très récemment que l'inhibition spécifique d'une interaction protéine-protéine était possible grâce à ces molécules, réalisées à l'aide d'analyses computationnelles et structurale (Corradi *et al.*, 2011). Ainsi, plusieurs 2P2I ont déjà été mis au point avec succès (Corradi *et al.*, 2011; Morelli *et al.*, 2011). Cette technique pourrait permettre de déterminer avec précision le rôle de chaque interaction, et donc de savoir à quel niveau du système ERQC intervient $G\alpha_{12}$. Mais le développement de ces molécules 2P2I nécessite énormément de moyens ainsi que la connaissance de la structure du complexe protéique mis en jeu.

Une inhibition indirecte pourrait alors être envisagée en diminuant l'expression de $G\alpha_{12}$ par siRNA. Cette technique a comme avantage d'être plus simple à mettre en œuvre, mais est moins spécifique. En effet, la diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ affecterait toutes les voies dépendantes de cette protéine.

Nos travaux ayant été réalisés principalement sur des systèmes d'expression hétérologues, la deuxième étape serait de mener cette étude sur des cellules épithéliales pulmonaires ainsi que sur des modèles animaux. En effet, il a été démontré que l'efficacité du processus de maturation de CFTR était plus importante dans les cellules épithéliales exprimant la protéine de manière endogène par rapport aux systèmes d'expression hétérologues (Varga *et al.*, 2004). L'inhibition de la dégradation de la protéine CFTR mutée dans les cellules épithéliales pourrait alors induire une fuite de CFTR-F508del vers la membrane apicale et permettre l'instauration d'une sécrétion d'ions chlorures. Il serait alors intéressant de moduler l'expression de $G\alpha_{12}$ dans les cellules épithéliales mucoviscidiques ainsi que dans des modèles mucoviscidiques murin (Lam *et al.*, 2011) afin d'étudier son effet sur la restauration ou non d'une activité canal chlorure à la membrane.

II) Implication de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans le contrôle des jonctions intercellulaires : cas de la mucoviscidose

Nous avons démontré dans la première partie de cette étude que la protéine $G\alpha_{12}$ joue un rôle dans le phénomène de dégradation protéique. Les résultats de notre deuxième partie indiquent quant à eux que la stabilité des protéines E-cadhérine et ZO-1 est perturbée dans les cellules mucoviscidosiques. L'étude du rôle de $G\alpha_{12}$ dans la stabilité de ces deux protéines pourrait donc fournir une information importante.

La diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ diminuant la résistance transépithéliale et augmentant l'invasion bactérienne par *Pseudomonas aeruginosa*, une perspective intéressante serait d'augmenter la quantité de $G\alpha_{12}$ dans les cellules mucoviscidosiques afin de vérifier si cette augmentation permet la restauration du TER au niveau de celui observé dans les cellules saines. Si tel est le cas, il est légitime de penser que cette restauration du TER pourrait augmenter la résistance de la monocouche cellulaire face à l'invasion bactérienne, un test d'invasion réalisé sur des cellules transfectées avec le gène $G\alpha_{12}$ devrait alors être réalisé. De même, la modulation des interactions entre $G\alpha_{12}$ et les protéines jonctionnelles donnerait des informations intéressantes quant à l'implication de chaque acteur protéique de ces jonctions.

Il est connu que $G\alpha_{12}$ peut agir *via* RhoA, qui elle-même intervient dans le contrôle des complexes jonctionnels. La détermination du rôle de RhoA dans le contrôle des jonctions par $G\alpha_{12}$ est donc importante. De même, l'effet de la phosphorylation de $G\alpha_{12}$ devrait être étudié.

A plus long terme, l'étude de l'effet de $G\alpha_{12}$ sur le TER et la résistance à l'invasion bactérienne au niveau de l'épithélium bronchique devrait être réalisée sur des modèles animaux, comme des souris mucoviscidosiques. Il serait intéressant de faire varier le niveau d'expression de $G\alpha_{12}$, en le diminuant par siRNA (Lam *et al.*, 2011) ou en l'augmentant par transfection du gène codant pour $G\alpha_{12}$ (Merkel *et al.*, 2011), dans ce modèle murin afin d'observer son rôle dans la résistance bactérienne *in vivo*. Ces résultats, s'ils sont concluants, pourraient mener au développement de thérapies agissant sur $G\alpha_{12}$, et permettant d'augmenter la résistance des malades face aux infections pulmonaires.

Nos études montrant une diminution de l'expression de $G\alpha_{12}$ dans la mucoviscidose, il serait important d'étudier les mécanismes de cette diminution (transcription moins importante, dégradation rapide des ARNm).

De plus, il n'existe aucun inhibiteur spécifique de $G\alpha_{12}$, rendant son étude difficile. Le développement d'une telle molécule serait donc un outil précieux pour l'étude de cette protéine dans divers phénomènes cellulaires. Pour cela, nous avons déjà entrepris de produire et purifier la protéine $G\alpha_{12}$, pour à terme élucider sa structure cristallographique qui permettrait le développement d'inhibiteurs.

Bibliographie



- Aasheim HC, Pedoutour F & Smeland EB. (1997). Characterization, expression and chromosomal localization of a human gene homologous to the mouse Lsc oncogene, with strongest expression in hematopoietic tissues. *Oncogene* **14**, 1747-1752.
- Abe K & Takeichi M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13-19.
- Agre P. (2006). The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 5-13.
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, González G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J & Nelson DA. (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423-426.
- Ahmadian MR, Mittal R, Hall A & Wittinghofer A. (1997). Aluminum fluoride associates with the small guanine nucleotide binding proteins. *FEBS Lett* **408**, 315-318.
- Ahner A & Brodsky JL. (2004). Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* **14**, 474-478.
- Akabas MH. (2000). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* **275**, 3729-3732.
- Akabas MH, Kaufmann C, Cook TA & Archdeacon P. (1994). Amino acid residues lining the chloride channel of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **269**, 14865-14868.
- Allin C, Ahmadian MR, Wittinghofer A & Gerwert K. (2001). Monitoring the GAP catalyzed H-Ras GTPase reaction at atomic resolution in real time. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7754-7759.
- Amshoff C, Jäck HM & Haas IG. (1999). Cycloheximide, a new tool to dissect specific steps in ER-associated degradation of different substrates. *Biol Chem* **380**, 669-677.
- Anastasiadis PZ. (2007). p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 34-46.
- Andersen D. (1938). Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study, pp. 344-399. *Am J Dis Child*.
- Andersen D & Hodges R. (1946). Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* **72**, 62-80.
- Andersen HU, Lannig S, Pressler T, Laugesen CS & Mathiesen ER. (2006). Cystic fibrosis-related diabetes: the presence of microvascular diabetes complications. *Diabetes Care* **29**, 2660-2663.
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE & Welsh MJ. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* **253**, 202-205.
- Andreeva AV, Kutuzov MA & Voyno-Yasenetskaya TA. (2008). G alpha12 is targeted to the mitochondria and affects mitochondrial morphology and motility. *FASEB J* **22**, 2821-2831.
- Angst BD, Marozzi C & Magee AI. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* **114**, 629-641.
- Aragay AM, Collins LR, Post GR, Watson AJ, Feramisco JR, Brown JH & Simon MI. (1995). G12 requirement for thrombin-stimulated gene expression and DNA synthesis in 1321N1 astrocytoma cells. *J Biol Chem* **270**, 20073-20077.
- Aridor M, Bannykh SI, Rowe T & Balch WE. (1995). Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol* **131**, 875-893.
- Ayoub MA, Trinquet E, Pflieger KD & Pin JP. (2010). Differential association modes of the thrombin receptor PAR1 with Galpha1, Galpha12, and beta-arrestin 1. *FASEB J* **24**, 3522-3535.



- Banales JM, Prieto J & Medina JF. (2006). Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World J Gastroenterol* **12**, 3496-3511.
- Bannykh SI, Bannykh GI, Fish KN, Moyer BD, Riordan JR & Balch WE. (2000). Traffic pattern of cystic fibrosis transmembrane regulator through the early exocytic pathway. *Traffic* **1**, 852-870.
- Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D & al-Awqati Q. (1991). Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* **352**, 70-73.
- Barker N & Clevers H. (2000). Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays* **22**, 961-965.
- Barriere H, Bagdany M, Bossard F, Okiyoneda T, Wojewodka G, Gruenert D, Radzioch D & Lukacs GL. (2009). Revisiting the role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and counterion permeability in the pH regulation of endocytic organelles. *Mol Biol Cell* **20**, 3125-3141.

- Barrière H, Apaja P, Okiyoneda T & Lukacs GL. (2011). Endocytic sorting of CFTR variants monitored by single-cell fluorescence ratiometric image analysis (FRIFA) in living cells. *Methods Mol Biol* **741**, 301-317.
- Barth AI, Näthke IS & Nelson WJ. (1997). Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 683-690.
- Bazzoni G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 525-530.
- Bear CE, Duguay F, Naismith AL, Kartner N, Hanrahan JW & Riordan JR. (1991). Cl⁻ channel activity in *Xenopus* oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J Biol Chem* **266**, 19142-19145.
- Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M & Riordan JR. (1992). Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* **68**, 809-818.
- Bebök Z, Mazzochi C, King SA, Hong JS & Sorscher EJ. (1998). The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J Biol Chem* **273**, 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 Lett* **327**, 337-342.
- Behrens J. (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* **18**, 15-30.
- Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM & Birchmeier W. (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **108**, 2435-2447.
- Benharouga M, Fritsch J, Banting G & Edelman A. (1997). Properties of chloride-conductive pathways in rat kidney cortical and outer-medulla brush-border membranes--inhibition by anti-(cystic fibrosis transmembrane regulator) mAbs. *Eur J Biochem* **246**, 367-372.
- Benharouga M, Haardt M, Kartner N & Lukacs GL. (2001). COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J Cell Biol* **153**, 957-970.
- Benharouga M, Lipecka J, Fanen P, Baudoin-Legros M, Banting G, Fritsch J & Edelman A. (1996). Properties of a Cl⁻-conductive pathway(s) in microsomes from rat kidney inner medulla. Involvement of cystic fibrosis transmembrane regulator protein. *Eur J Biochem* **240**, 268-273.
- Benharouga M, Sharma M, So J, Haardt M, Drzymala L, Popov M, Schwapach B, Grinstein S, Du K & Lukacs GL. (2003). The role of the C terminus and Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor in the functional expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in nonpolarized cells and epithelia. *J Biol Chem* **278**, 22079-22089.
- Berdiev BK, Prat AG, Cantiello HF, Ausiello DA, Fuller CM, Jovov B, Benos DJ & Ismailov II. (1996). Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments. *J Biol Chem* **271**, 17704-17710.
- Berger HA & Welsh MJ. (1991). Electrolyte transport in the lungs. *Hosp Pract (Off Ed)* **26**, 53-59.
- Bergeron JJ, Zapun A, Ou WJ, Hemming R, Parlati F, Cameron PH & Thomas DY. (1998). The role of the lectin calnexin in conformation independent binding to N-linked glycoproteins and quality control. *Adv Exp Med Biol* **435**, 105-116.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP & Ron D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332.
- Bertrand CA & Frizzell RA. (2003). The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C1-18.
- Bilan F, Thoreau V, Nacfer M, Dérand R, Norez C, Cantereau A, Garcia M, Becq F & Kitzis A. (2004). Syntaxin 8 impairs trafficking of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and inhibits its channel activity. *J Cell Sci* **117**, 1923-1935.
- Biwersi J, Emans N & Verkman AS. (1996). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation stimulates endosome fusion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12484-12489.
- Blaschuk OW, Sullivan R, David S & Pouliot Y. (1990). Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* **139**, 227-229.
- Blaug S, Hybiske K, Cohn J, Firestone GL, Machen TE & Miller SS. (2001). ENaC- and CFTR-dependent ion and fluid transport in mammary epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C633-648.
- Boekhoff I, Inglese J, Schleicher S, Koch WJ, Lefkowitz RJ & Breer H. (1994). Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **269**, 37-40.
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM & Shapiro L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* **296**, 1308-1313.

- Bonifacino JS & Weissman AM. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 19-57.
- Bossard F, Robay A, Toumaniantz G, Dahimene S, Becq F, Merot J & Gauthier C. (2007). NHE-RF1 protein rescues DeltaF508-CFTR function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**, L1085-1094.
- Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L & Gatzky JT. (1986). Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* **78**, 1245-1252.
- Bourne HR. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 134-142.
- Bourne HR, Sanders DA & McCormick F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.
- Bradbury NA, Cohn JA, Venglarik CJ & Bridges RJ. (1994). Biochemical and biophysical identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels as components of endocytic clathrin-coated vesicles. *J Biol Chem* **269**, 8296-8302.
- Braude S, Kennedy H, Hodson M & Batten J. (1984). Hypertrophic osteoarthropathy in cystic fibrosis. *Br Med J (Clin Res Ed)* **288**, 822-823.
- Brodsky JL. (2001). Chaperoning the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L39-42.
- Brodsky JL & McCracken AA. (1999). ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 507-513.
- Brown CR, Hong-Brown LQ, Biwersi J, Verkman AS & Welch WJ. (1996). Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* **1**, 117-125.
- Buchner J. (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J* **10**, 10-19.
- Burghardt B, Elkaer ML, Kwon TH, Rácz GZ, Varga G, Steward MC & Nielsen S. (2003). Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut* **52**, 1008-1016.
- Burns DL. (1988). Subunit structure and enzymic activity of pertussis toxin. *Microbiol Sci* **5**, 285-287.
- Cabral CM, Choudhury P, Liu Y & Sifers RN. (2000). Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways. *J Biol Chem* **275**, 25015-25022.



- Cahill P, Nason MW, Ambrose C, Yao TY, Thomas P & Egan ME. (2000). Identification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator domains that are important for interactions with ROMK2. *J Biol Chem* **275**, 16697-16701.
- Cannon CL, Kowalski MP, Stopak KS & Pier GB. (2003). Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**, 188-197.
- Cantiello HF. (1996). Role of the actin cytoskeleton in the regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Exp Physiol* **81**, 505-514.
- Castagna I, Roszkowska AM, Famà F, Sinicropi S & Ferreri G. (2001). The eye in cystic fibrosis. *Eur J Ophthalmol* **11**, 9-14.
- Cavallo D, Rudy D, Mohammadi A, Macri J & Adeli K. (1999). Studies on degradative mechanisms mediating post-translational fragmentation of apolipoprotein B and the generation of the 70-kDa fragment. *J Biol Chem* **274**, 23135-23143.
- Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL & Brenner MB. (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* **372**, 190-193.
- Chabot H, Vives MF, 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**, 175-188.
- Chamberlain LH, Graham ME, Kane S, Jackson JL, Maier VH, Burgoyne RD & Gould GW. (2001). The 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**, 445-455.
- Chan AM, Fleming TP, McGovern ES, Chedid M, Miki T & Aaronson SA. (1993). Expression cDNA cloning of a transforming gene encoding the wild-type G alpha 12 gene product. *Mol Cell Biol* **13**, 762-768.
- Chang FH & Bourne HR. (1989). Cholera toxin induces cAMP-independent degradation of Gs. *J Biol Chem* **264**, 5352-5357.

- Chang MH, Plata C, Sindic A, Ranatunga WK, Chen AP, Zandi-Nejad K, Chan KW, Thompson J, Mount DB & Romero MF. (2009). Slc26a9 is inhibited by the R-region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via the STAS domain. *J Biol Chem* **284**, 28306-28318.
- Chang XB, Cui L, Hou YX, Jensen TJ, Aleksandrov AA, Mengos A & Riordan JR. (1999). Removal of multiple arginine-framed trafficking signals overcomes misprocessing of delta F508 CFTR present in most patients with cystic fibrosis. *Mol Cell* **4**, 137-142.
- Chang XB, Hou YX, Jensen TJ & Riordan JR. (1994). Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J Biol Chem* **269**, 18572-18575.
- Chang XB, Mengos A, Hou YX, Cui L, Jensen TJ, Aleksandrov A, Riordan JR & Gentsch M. (2008). Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *J Cell Sci* **121**, 2814-2823.
- Chartier NT, Oddou CI, Lainé MG, Ducarouge B, Marie CA, Block MR & Jacquier-Sarlin MR. (2007). Cyclin-dependent kinase 2/cyclin E complex is involved in p120 catenin (p120ctn)-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer. *Cancer Res* **67**, 9781-9790.
- Chen CP, Posy S, Ben-Shaul A, Shapiro L & Honig BH. (2005a). Specificity of cell-cell adhesion by classical cadherins: Critical role for low-affinity dimerization through beta-strand swapping. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8531-8536.
- Chen EY, Bartlett MC & Clarke DM. (2000). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator has an altered structure when its maturation is inhibited. *Biochemistry* **39**, 3797-3803.
- Chen EY, Bartlett MC, Loo TW & Clarke DM. (2004). The DeltaF508 mutation disrupts packing of the transmembrane segments of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **279**, 39620-39627.
- Chen G, Fröhlich O, Yang Y, Klein JD & Sands JM. (2006). Loss of N-linked glycosylation reduces urea transporter UT-A1 response to vasopressin. *J Biol Chem* **281**, 27436-27442.
- Chen JH, Chang XB, Aleksandrov AA & Riordan JR. (2002). CFTR is a monomer: biochemical and functional evidence. *J Membr Biol* **188**, 55-71.
- Chen W, Helenius J, Braakman I & Helenius A. (1995). Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6229-6233.
- Chen X, Kojima S, Borisy GG & Green KJ. (2003). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* **163**, 547-557.
- Chen Z, Singer WD, Sternweis PC & Sprang SR. (2005b). Structure of the p115RhoGEF rgRGS domain-Galpa13/i1 chimera complex suggests convergent evolution of a GTPase activator. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 191-197.
- Cheng J, Moyer BD, Milewski M, Loffing J, Ikeda M, Mickle JE, Cutting GR, Li M, Stanton BA & Guggino WB. (2002). A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J Biol Chem* **277**, 3520-3529.
- Cheng J, Wang H & Guggino WB. (2004). Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J Biol Chem* **279**, 1892-1898.
- Cheng SH, Fang SL, Zabner J, Marshall J, Piraino S, Schiavi SC, Jefferson DM, Welsh MJ & Smith AE. (1995). Functional activation of the cystic fibrosis trafficking mutant delta F508-CFTR by overexpression. *Am J Physiol* **268**, L615-624.
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR & Smith AE. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63**, 827-834.
- Cheung KH, Leung CT, Leung GP & Wong PY. (2003). Synergistic effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and aquaporin-9 in the rat epididymis. *Biol Reprod* **68**, 1505-1510.
- Cheung M & Akabas MH. (1996). Identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel-lining residues in and flanking the M6 membrane-spanning segment. *Biophys J* **70**, 2688-2695.
- Cheung M & Akabas MH. (1997). Locating the anion-selectivity filter of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel. *J Gen Physiol* **109**, 289-299.
- Chevet E, Cameron PH, Pelletier MF, Thomas DY & Bergeron JJ. (2001). The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 120-124.
- Chiasson CM, Wittich KB, Vincent PA, Faundez V & Kowalczyk AP. (2009). p120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a Rho-independent mechanism. *Mol Biol Cell* **20**, 1970-1980.
- Chitaev NA & Troyanovsky SM. (1998). Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J Cell Biol* **142**, 837-846.
- Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ & Muallem S. (2001). Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* **410**, 94-97.

- Choo-Kang LR & Zeitlin PL. (2001). Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L58-68.
- Chung WC & Kermod JC. (2005). Suramin disrupts receptor-G protein coupling by blocking association of G protein alpha and betagamma subunits. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 191-198.
- Clabecq A, Henry JP & Darchen F. (2000). Biochemical characterization of Rab3-GTPase-activating protein reveals a mechanism similar to that of Ras-GAP. *J Biol Chem* **275**, 31786-31791.
- Clapham DE & Neer EJ. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 167-203.
- Cohen AM, Yulish BS, Wasser KB, Vignos PJ, Jones PK & Sorin SB. (1986). Evaluation of pulmonary hypertrophic osteoarthropathy in cystic fibrosis. A comprehensive study. *Am J Dis Child* **140**, 74-77.
- Conti LR, Radeke CM & Vandenberg CA. (2002). Membrane targeting of ATP-sensitive potassium channel. Effects of glycosylation on surface expression. *J Biol Chem* **277**, 25416-25422.
- Corradi V, Mancini M, Santucci MA, Carlomagno T, Sanfelice D, Mori M, Vignaroli G, Falchi F, Manetti F, Radi M & Botta M. (2011). Computational techniques are valuable tools for the discovery of protein-protein interaction inhibitors: The 14-3-3 σ case. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 6867-6871.
- Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohri T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH & Gruenert DC. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**, 38-47.
- Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A & Higgins CF. (1991). Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9262-9266.
- Cystic Fibrosis Mutation DataBase Statistics. <http://www.genet.sickkids.on.ca>.
- Cystic_Fibrosis_Foundation. (2005). CFF Patient Registry, Bethesda, Maryland.
- Cystic_Fibrosis_Foundation. (2006). CFF Patient Registry, Bethesda, Maryland.
- Cystic_Fibrosis_Foundation. (2008). CFF Patient Registry, Bethesda, Maryland.
- Cystic_Fibrosis_Mutation_DataBase_Statistics. <http://www.genet.sickkids.on.ca>.



- Da T & Verkman AS. (2004). Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 4477-4483.
- Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq JP & Lazdunski M. (1991). Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* **354**, 526-528.
- Daniel CW, Strickland P & Friedmann Y. (1995). Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth. *Dev Biol* **169**, 511-519.
- Daniel JM. (2007). Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 59-68.
- Daniel JM & Reynolds AB. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* **19**, 3614-3623.
- Darling R, di Sant'Agnese P, Perera G & Andersen D. (1953). Electrolyte abnormalities of the sweat in fibrocystic disease of the pancreas. *Am J Med Sci* **225**, 67-70.
- Dave RH, Saengsawang W, Yu JZ, Donati R & Rasenick MM. (2009). Heterotrimeric G-proteins interact directly with cytoskeletal components to modify microtubule-dependent cellular processes. *Neurosignals* **17**, 100-108.
- Davis MA, Ireton RC & Reynolds AB. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* **163**, 525-534.
- De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Simard F & Aubin G. (1997). Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet* **101**, 208-211.
- De Keukeleire B, Micoud J, Biard J & Benharouga M. (2008). Endoplasmic reticulum-associated degradation of mutant CFTR requires a guanine nucleotide-sensitive step. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1729-1742.
- Dejana E, Orsenigo F, Molendini C, Baluk P & McDonald DM. (2009). Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res* **335**, 17-25.
- Denker BM, Saha C, Khawaja S & Nigam SK. (1996). Involvement of a heterotrimeric G protein alpha subunit in tight junction biogenesis. *J Biol Chem* **271**, 25750-25753.
- Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE & Welsh MJ. (1992a). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761-764.
- Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng SH, Smith AE & Welsh MJ. (1992b). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J Clin Invest* **89**, 339-349.

- Dettlaff-Swiercz DA, Wettschureck N, Moers A, Huber K & Offermanns S. (2005). Characteristic defects in neural crest cell-specific Galphaq/Galpha11- and Galpha12/Galpha13-deficient mice. *Dev Biol* **282**, 174-182.
- Dhanasekaran N & Dermott JM. (1996). Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal* **8**, 235-245.
- Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, Huang P, Tong J, Naren AP, Bindokas V, Palfrey HC & Nelson DJ. (2006). CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* **8**, 933-944.
- di Sant'Agnes P, Darling R, Perera G & Shea E. (1953). Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* **12**, 549-563.
- Dodane V & Kachar B. (1996). Identification of isoforms of G proteins and PKC that colocalize with tight junctions. *J Membr Biol* **149**, 199-209.
- Dohlman HG & Thorner J. (1997). RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* **272**, 3871-3874.
- Donato R, Wood SA, Saunders I, Gundsambuu B, Yan Mak K, Abbott CA & Powell BC. (2009). Regulation of epithelial apical junctions and barrier function by Galpha13. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1228-1235.
- 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.
- Dormer RL, McNeilly CM, Morris MR, Pereira MM, Doull IJ, Becq F, Mettey Y, Vierfond JM & McPherson MA. (2001). Localisation of wild-type and DeltaF508-CFTR in nasal epithelial cells. *Pflugers Arch* **443 Suppl 1**, S117-120.
- Drumm ML, Wilkinson DJ, Smit LS, Worrell RT, Strong TV, Frizzell RA, Dawson DC & Collins FS. (1991). Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* **254**, 1797-1799.
- Du K, Sharma M & Lukacs GL. (2005). The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 17-25.
- Durie PR, Ahmed N, Corey M, Zielenski J, Ellis E & Tsui L-C. (1999). CFTR gene mutations and the pancreatic phenotype. *Pediatr Pulmonol Suppl* **19**, 2.



- Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PL, Carter BJ & Guggino WB. (1992). Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* **358**, 581-584.
- Egan ME, Glöckner-Pagel J, Ambrose C, Cahill PA, Pappoe L, Balamuth N, Cho E, Canny S, Wagner CA, Geibel J & Caplan MJ. (2002). Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat Med* **8**, 485-492.
- Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glöckner-Pagel J, Canny S, Du K, Lukacs GL & Caplan MJ. (2004). Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* **304**, 600-602.
- Eggermont E & De Boeck K. (1991). Small-intestinal abnormalities in cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr* **150**, 824-828.
- Elgavish A. (1991). High intracellular pH in CFPAC: a pancreas cell line from a patient with cystic fibrosis is lowered by retrovirus-mediated CFTR gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* **180**, 342-348.
- Ellgaard L & Helenius A. (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 431-437.
- Ellgaard L & Helenius A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-191.
- Ellsworth RE, Jamison DC, Touchman JW, Chissoe SL, Braden Maduro VV, Bouffard GG, Dietrich NL, Beckstrom-Sternberg SM, Iyer LM, Weintraub LA, Cotton M, Courtney L, Edwards J, Maupin R, Ozersky P, Rohlfing T, Wohldmann P, Miner T, Kemp K, Kramer J, Korf I, Pepin K, Antonacci-Fulton L, Fulton RS, Minx P, Hillier LW, Wilson RK, Waterston RH, Miller W & Green ED. (2000). Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1172-1177.
- 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**, 46237-46242.
- Espada J, Pérez-Moreno M, Braga VM, Rodriguez-Viciano P & Cano A. (1999). H-Ras activation promotes cytoplasmic accumulation and phosphoinositide 3-OH kinase association of beta-catenin in epidermal keratinocytes. *J Cell Biol* **146**, 967-980.

- Etienne-Manneville S & Hall A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Fanconi G, Uehlinger E & Knauer C. (1936). *Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien*, pp. 753-756. Wien Med Wschr.



- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA & Anderson JM. (1998). The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **273**, 29745-29753.
- Fanning AS, Ma TY & Anderson JM. (2002). Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J* **16**, 1835-1837.
- Farber S. (1943). Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome, pp. 653-682. N Engl J Med.
- Farinha CM & Amaral MD. (2005). Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol Cell Biol* **25**, 5242-5252.
- Farinha CM, Nogueira P, Mendes F, Penque D & Amaral MD. (2002). The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem J* **366**, 797-806.
- Feldman GJ, Mullin JM & Ryan MP. (2005). Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 883-917.
- Fields TA & Casey PJ. (1997). Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* **321** (Pt 3), 561-571.
- Fischer H, Fukuda N, Barbry P, Illek B, Sartori C & Matthay MA. (2001). Partial restoration of defective chloride conductance in DeltaF508 CF mice by trimethylamine oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L52-57.
- Fishburn CS, Herzmark P, Morales J & Bourne HR. (1999). Gbetagamma and palmitate target newly synthesized Galphaz to the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**, 18793-18800.
- Fleiszig SM, Evans DJ, Do N, Vallas V, Shin S & Mostov KE. (1997). Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity. *Infect Immun* **65**, 2861-2867.
- Francis SA, Shen X, Young JB, Kaul P & Lerner DJ. (2006). Rho GEF Lsc is required for normal polarization, migration, and adhesion of formyl-peptide-stimulated neutrophils. *Blood* **107**, 1627-1635.
- Frelet A & Klein M. (2006). Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Lett* **580**, 1064-1084.
- Fujita Y, Krause G, Scheffner M, Zechner D, Leddy HE, Behrens J, Sommer T & Birchmeier W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* **4**, 222-231.
- Fukuhara S, Chikumi H & Gutkind JS. (2001). RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* **20**, 1661-1668.
- Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T & Gutkind JS. (1999). A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* **274**, 5868-5879.



- Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC & Stutts MJ. (1993). CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* **363**, 263-268.
- Gadsby DC & Nairn AC. (1999). Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev* **79**, S77-S107.
- Gadsby DC, Vergani P & Csanády L. (2006). The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477-483.
- Ganeshan R, Di A, Nelson DJ, Quick MW & Kirk KL. (2003). The interaction between syntaxin 1A and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels is mechanistically distinct from syntaxin 1A-SNARE interactions. *J Biol Chem* **278**, 2876-2885.
- Gates J & Peifer M. (2005). Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell* **123**, 769-772.
- Gekko K & Timasheff SN. (1981a). Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* **20**, 4667-4676.
- Gekko K & Timasheff SN. (1981b). Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* **20**, 4677-4686.

- Gelman MS, Kannegaard ES & Kopito RR. (2002). A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **277**, 11709-11714.
- Gentzsch M, Chang XB, Cui L, Wu Y, Ozols VV, Choudhury A, Pagano RE & Riordan JR. (2004). Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* **15**, 2684-2696.
- Gething MJ & Sambrook J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Gibson L & Cooke R. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* **23**, 545-549.
- Gilbert A, Jadot M, Leontieva E, Wattiaux-De Coninck S & Wattiaux R. (1998). Delta F508 CFTR localizes in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in cystic fibrosis cells. *Exp Cell Res* **242**, 144-152.
- Gilman AG. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**, 615-649.
- Girkontaite I, Missy K, Sakk V, Harenberg A, Tedford K, Pötzel T, Pfeffer K & Fischer KD. (2001). Lsc is required for marginal zone B cells, regulation of lymphocyte motility and immune responses. *Nat Immunol* **2**, 855-862.
- Girodon-Boulandet E & Costa C. (2005). Génétique de la mucoviscidose, pp. 126-134. mt pédiatrie.
- Glozman R, Okiyonedo T, Mulvihill CM, Rini JM, Barriere H & Lukacs GL. (2009). N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* **184**, 847-862.
- Gohla A, Schultz G & Offermanns S. (2000). Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res* **87**, 221-227.
- Gong Q, Anderson CL, January CT & Zhou Z. (2002). Role of glycosylation in cell surface expression and stability of HERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H77-84.
- Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L & Kaufman JD. (2004). Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **169**, 816-821.
- Gregory RJ, Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Paul S, Hehir K, Ostedgaard L, Klinger KW, Welsh MJ & Smith AE. (1990). Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* **347**, 382-386.
- Gruenert DC, Finkbeiner WE & Widdicombe JH. (1995). Culture and transformation of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* **268**, L347-360.
- Guggino WB. (2004). The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc Am Thorac Soc* **1**, 28-32.
- Guggino WB & Stanton BA. (2006). New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 426-436.
- Gumbiner B, Lowenkopf T & Apatira D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3460-3464.



- Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N & Lukacs GL. (1999). C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* **274**, 21873-21877.
- Haggie PM, Stanton BA & Verkman AS. (2004). Increased diffusional mobility of CFTR at the plasma membrane after deletion of its C-terminal PDZ binding motif. *J Biol Chem* **279**, 5494-5500.
- Hamann S. (2002). Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol* **215**, 395-431.
- Hamilton SE & Nathanson NM. (1997). Differential localization of G-proteins, G alpha o and G alpha i-1, -2, and -3, in polarized epithelial MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 1-7.
- Hamm HE. (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* **273**, 669-672.
- Hamm HE & Gilchrist A. (1996). Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 189-196.
- 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 U S A* **91**, 913-917.
- Hardin DS, LeBlanc A, Lukenbough S & Seilheimer DK. (1997). Insulin resistance is associated with decreased clinical status in cystic fibrosis. *J Pediatr* **130**, 948-956.
- Harding HP, Zhang Y & Ron D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-274.
- Harhaj NS & Antonetti DA. (2004). Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1206-1237.

- Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC & Bollag G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science* **280**, 2112-2114.
- Hart MJ, Sharma S, elMasry N, Qiu RG, McCabe P, Polakis P & Bollag G. (1996). Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *J Biol Chem* **271**, 25452-25458.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J & Stevenson BR. (1998). ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* **141**, 199-208.
- Haws CM, Nepomuceno IB, Krouse ME, Wakelee H, Law T, Xia Y, Nguyen H & Wine JJ. (1996). Delta F508-CFTR channels: kinetics, activation by forskolin, and potentiation by xanthines. *Am J Physiol* **270**, C1544-1555.
- 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 DN, Foellmer B & Helenius A. (1995). Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**, 425-433.
- Hegedus T, Aleksandrov A, Cui L, Gentsch M, Chang XB & Riordan JR. (2006). F508del CFTR with two altered RXR motifs escapes from ER quality control but its channel activity is thermally sensitive. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 565-572.
- Hegedüs T, Sessler T, Scott R, Thelin W, Bakos E, Váradi A, Szabó K, Homolya L, Milgram SL & Sarkadi B. (2003). C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **302**, 454-461.
- Heinemann FS & Ozols J. (1998). Degradation of stearyl-coenzyme A desaturase: endoproteolytic cleavage by an integral membrane protease. *Mol Biol Cell* **9**, 3445-3453.
- Hermans E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **99**, 25-44.
- Hessling M, Richter K & Buchner J. (2009). Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 287-293.
- Higgins CF & Linton KJ. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 918-926.
- Hiley E, McMullan R & Nurrish SJ. (2006). The Galpha12-RGS RhoGEF-RhoA signalling pathway regulates neurotransmitter release in *C. elegans*. *EMBO J* **25**, 5884-5895.
- Hirai Y, Nose A, Kobayashi S & Takeichi M. (1989a). Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. I. Lung epithelial morphogenesis. *Development* **105**, 263-270.
- Hirai Y, Nose A, Kobayashi S & Takeichi M. (1989b). Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II. Skin morphogenesis. *Development* **105**, 271-277.
- Ho MK & Wong YH. (1998). Structure and function of the pertussis-toxin-insensitive Gz protein. *Biol Signals Recept* **7**, 80-89.
- Holsclaw DS, Perlmutter AD, Jockin H & Shwachman H. (1971). Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol* **106**, 568-574.
- Honma S, Saika M, Ohkubo S, Kurose H & Nakahata N. (2006). Thromboxane A2 receptor-mediated G12/13-dependent glial morphological change. *Eur J Pharmacol* **545**, 100-108.
- Hsia JA, Moss J, Hewlett EL & Vaughan M. (1984). ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding. *J Biol Chem* **259**, 1086-1090.
- Hu W, Howard M & Lukacs GL. (2001). Multiple endocytic signals in the C-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem J* **354**, 561-572.
- Huang S, Dudez T, Scerri I, Thomas MA, Giepmans BN, Suter S & Chanson M. (2003). Defective activation of c-Src in cystic fibrosis airway epithelial cells results in loss of tumor necrosis factor-alpha-induced gap junction regulation. *J Biol Chem* **278**, 8326-8332.
- Humlicek AL, Manzel LJ, Chin CL, Shi L, Excoffon KJ, Winter MC, Shasby DM & Look DC. (2007). Paracellular permeability restricts airway epithelial responses to selectively allow activation by mediators at the basolateral surface. *J Immunol* **178**, 6395-6403.
- Hwang TC, Nagel G, Nairn AC & Gadsby DC. (1994). Regulation of the gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator C1 channels by phosphorylation and ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4698-4702.
- Hwang TC, Wang F, Yang IC & Reenstra WW. (1997). Genistein potentiates wild-type and delta F508-CFTR channel activity. *Am J Physiol* **273**, C988-998.



- Ikenouchi J, Umeda K, Tsukita S & Furuse M. (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J Cell Biol* **176**, 779-786.
- Illek B, Maurisse R, Wahler L, Kunzelmann K, Fischer H & Gruenert DC. (2008). Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates with CFTR mRNA expression levels. *Cell Physiol Biochem* **22**, 57-68.
- Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, 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**, 1166-1170.
- Iretton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F & Reynolds AB. (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* **159**, 465-476.
- Itoh M, Morita K & Tsukita S. (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* **274**, 5981-5986.
- Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S & Tsukita S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* **138**, 181-192.



- Jakob CA, Bodmer D, Spirig U, Battig P, Marcil A, Dignard D, Bergeron JJ, Thomas DY & Aepli M. (2001). Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* **2**, 423-430.
- Jarry TM & Cheung AL. (2006). Staphylococcus aureus escapes more efficiently from the phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. *Infect Immun* **74**, 2568-2577.
- Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL & Riordan JR. (1995). Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**, 129-135.
- Jho EH, Davis RJ & Malbon CC. (1997). c-Jun amino-terminal kinase is regulated by Galpha12/Galpha13 and obligate for differentiation of P19 embryonal carcinoma cells by retinoic acid. *J Biol Chem* **272**, 24468-24474.
- Jho EH & Malbon CC. (1997). Galpha12 and Galpha13 mediate differentiation of P19 mouse embryonal carcinoma cells in response to retinoic acid. *J Biol Chem* **272**, 24461-24467.
- Jiang C, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, McCray PB & Miller SS. (1993a). Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science* **262**, 424-427.
- Jiang C, Finkbeiner WE, Widdicombe JH & Miller SS. (1997). Fluid transport across cultures of human tracheal glands is altered in cystic fibrosis. *J Physiol* **501** (Pt 3), 637-647.
- Jiang H, Wu D & Simon MI. (1993b). The transforming activity of activated G alpha 12. *FEBS Lett* **330**, 319-322.
- Jiang LI, Collins J, Davis R, Fraser ID & Sternweis PC. (2008). Regulation of cAMP responses by the G12/13 pathway converges on adenylyl cyclase VII. *J Biol Chem* **283**, 23429-23439.
- Johnston JA, Ward CL & Kopito RR. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-1898.
- Jones TL & Gutkind JS. (1998). Galpha12 requires acylation for its transforming activity. *Biochemistry* **37**, 3196-3202.
- Jouret F, Bernard A, Hermans C, Dom G, Terryn S, Leal T, Lebecque P, Cassiman JJ, Scholte BJ, de Jonge HR, Courtoy PJ & Devuyst O. (2007). Cystic fibrosis is associated with a defect in apical receptor-mediated endocytosis in mouse and human kidney. *J Am Soc Nephrol* **18**, 707-718.
- Jovov B, Ismailov II, Berdiev BK, Fuller CM, Sorscher EJ, Dedman JR, Kaetzel MA & Benos DJ. (1995). Interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and outwardly rectified chloride channels. *J Biol Chem* **270**, 29194-29200.
- 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**, 229-239.



- Kahn RA. (1991). Fluoride is not an activator of the smaller (20-25 kDa) GTP-binding proteins. *J Biol Chem* **266**, 15595-15597.
- Kanaho Y, Moss J & Vaughan M. (1985). Mechanism of inhibition of transducin GTPase activity by fluoride and aluminum. *J Biol Chem* **260**, 11493-11497.
- Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT & Holsclaw DS. (1968). Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **279**, 65-69.
- Katoh H, Aoki J, Yamaguchi Y, Kitano Y, Ichikawa A & Negishi M. (1998). Constitutively active Galpha12, Galpha13, and Galphaq induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways. *J Biol Chem* **273**, 28700-28707.
- Kelley TJ, al-Nakkash L & Drumm ML. (1995). CFTR-mediated chloride permeability is regulated by type III phosphodiesterases in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **13**, 657-664.
- Kelly P, Casey PJ & Meigs TE. (2007). Biologic functions of the G12 subfamily of heterotrimeric G proteins: growth, migration, and metastasis. *Biochemistry* **46**, 6677-6687.
- Kelly P, Moeller BJ, Juneja J, Booden MA, Der CJ, Daaka Y, Dewhirst MW, Fields TA & Casey PJ. (2006a). The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8173-8178.
- Kelly P, Stemmler LN, Madden JF, Fields TA, Daaka Y & Casey PJ. (2006b). A role for the G12 family of heterotrimeric G proteins in prostate cancer invasion. *J Biol Chem* **281**, 26483-26490.
- Kerbiriou M, Le Drévo MA, Férec C & Trouvé P. (2007). Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 1236-1249.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M & Tsui LC. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073-1080.
- Khair OA, Davies RJ & Devalia JL. (1996). Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* **9**, 1913-1922.
- Klein I, Sarkadi B & Váradi A. (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 237-262.
- Knowles M, Gatzky J & Boucher R. (1981). Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* **305**, 1489-1495.
- Knowles MR & Boucher RC. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* **109**, 571-577.
- Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT & Boucher RC. (1983). Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* **221**, 1067-1070.
- Knudsen KA, Myers L & McElwee SA. (1990). A role for the Ca²⁺-dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Exp Cell Res* **188**, 175-184.
- Kobielak A & Fuchs E. (2004). Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 614-625.
- Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, Kidd JF, Wang Y, Leslie EM, Cole SP & Bear CE. (2003). CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J* **22**, 1981-1989.
- Kojima T, Sawada N, Chiba H, Kokai Y, Yamamoto M, Urban M, Lee GH, Hertzberg EL, Mochizuki Y & Spray DC. (1999). Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes: connexin 32 interacts with occludin. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 222-229.
- Kong F, Young L, Chen Y, Ran H, Meyers M, Joseph P, Cho YH, Hassett DJ & Lau GW. (2006). Pseudomonas aeruginosa pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell Microbiol* **8**, 1121-1133.
- Kopito RR. (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* **79**, S167-173.
- Kotani K, Yonezawa K, Hara K, Ueda H, Kitamura Y, Sakaue H, Ando A, Chavanieu A, Calas B & Grigorescu F. (1994). Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *EMBO J* **13**, 2313-2321.
- Koulov AV, Lapointe P, Lu B, Razvi A, Coppinger J, Dong MQ, Matteson J, Laister R, Arrowsmith C, Yates JR & Balch WE. (2010). Biological and structural basis for Aha1 regulation of Hsp90 ATPase activity in maintaining proteostasis in the human disease cystic fibrosis. *Mol Biol Cell* **21**, 871-884.
- Kourlas PJ, Strout MP, Becknell B, Veronese ML, Croce CM, Theil KS, Krahe R, Ruutu T, Knuutila S, Bloomfield CD & Caligiuri MA. (2000). Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2145-2150.
- Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G & Sternweis PC. (1998). p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science* **280**, 2109-2111.

- Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A & Moolenaar WH. (1999). Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and G α 12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell* **10**, 1851-1857.
- Kreutz B, Yau DM, Nance MR, Tanabe S, Tesmer JJ & Kozasa T. (2006). A new approach to producing functional G α subunits yields the activated and deactivated structures of G α (12/13) proteins. *Biochemistry* **45**, 167-174.
- Kuehn MJ & Schekman R. (1997). COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 477-483.
- Kuner R, Swiercz JM, Zywiets A, Tappe A & Offermanns S. (2002). Characterization of the expression of PDZ-RhoGEF, LARG and G α (12)/G α (13) proteins in the murine nervous system. *Eur J Neurosci* **16**, 2333-2341.
- Kunzelmann K, Kiser GL, Schreiber R & Riordan JR. (1997). Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* **400**, 341-344.
- Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, Kuo WL, Stanton BA & Gruenert DC. (1993). An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **8**, 522-529.
- Kwon SH, Pollard H & Guggino WB. (2007). Knockdown of NHERF1 enhances degradation of temperature rescued DeltaF508 CFTR from the cell surface of human airway cells. *Cell Physiol Biochem* **20**, 763-772.
- Kälin N, Claass A, Sommer M, Puchelle E & Tümmler B. (1999). DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* **103**, 1379-1389.



- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lagunowich LA & Grunwald GB. (1989). Expression of calcium-dependent cell adhesion during ocular development: a biochemical, histochemical and functional analysis. *Dev Biol* **135**, 158-171.
- Lam JK, Liang W & Chan HK. (2011). Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*.
- Lannig S. (1996). Diabetes mellitus in cystic fibrosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **8**, 744-747.
- Lapierre LA, Tuma PL, Navarre J, Goldenring JR & Anderson JM. (1999). VAP-33 localizes to both an intracellular vesicle population and with occludin at the tight junction. *J Cell Sci* **112** (Pt 21), 3723-3732.
- Lee A, Chow D, Haus B, Tseng W, Evans D, Fleiszig S, Chandy G & Machen T. (1999a). Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol* **277**, L204-217.
- Lee JH, Richter W, Namkung W, Kim KH, Kim E, Conti M & Lee MG. (2007). Dynamic regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by competitive interactions of molecular adaptors. *J Biol Chem* **282**, 10414-10422.
- Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ & Muallem S. (1999b). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. *J Biol Chem* **274**, 14670-14677.
- Lee MG, Wigley WC, Zeng W, Noel LE, Marino CR, Thomas PJ & Muallem S. (1999c). Regulation of Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. *J Biol Chem* **274**, 3414-3421.
- LeSimple P, Liao J, Robert R, Gruenert DC & Hanrahan JW. (2010). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. *J Physiol* **588**, 1195-1209.
- Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino WB, Hendrickson WA, Hunt JF, Kearins MC, Lorimer D, Maloney PC, Post KW, Rajashankar KR, Rutter ME, Sauder JM, Shriver S, Thibodeau PH, Thomas PJ, Zhang M, Zhao X & Emtage S. (2004). Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* **23**, 282-293.
- Lewis HA, Zhao X, Wang C, Sauder JM, Rooney I, Noland BW, Lorimer D, Kearins MC, Connors K, Condon B, Maloney PC, Guggino WB, Hunt JF & Emtage S. (2005). Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J Biol Chem* **280**, 1346-1353.
- Lewis SA, Berg JR & Kleine TJ. (1995). Modulation of epithelial permeability by extracellular macromolecules. *Physiol Rev* **75**, 561-589.

- Li C, Krishnamurthy PC, Penmatsa H, Marrs KL, Wang XQ, Zaccolo M, Jalink K, Li M, Nelson DJ, Schuetz JD & Naren AP. (2007). Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell* **131**, 940-951.
- Li C & Naren AP. (2005). Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol Ther* **108**, 208-223.
- Li C, Roy K, Dandridge K & Naren AP. (2004). Molecular assembly of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in plasma membrane. *J Biol Chem* **279**, 24673-24684.
- Li L. (2003). The biochemistry and physiology of metallic fluoride: action, mechanism, and implications. *Crit Rev Oral Biol Med* **14**, 100-114.
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W & Todaro G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* **17**, 62-70.
- Lin F, Chen S, Sepich DS, Panizzi JR, Clendenon SG, Marrs JA, Hamm HE & Solnica-Krezel L. (2009). Galpha12/13 regulate epiboly by inhibiting E-cadherin activity and modulating the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **184**, 909-921.
- Lin F, Sepich DS, Chen S, Topczewski J, Yin C, Solnica-Krezel L & Hamm H. (2005). Essential roles of G{alpha}12/13 signaling in distinct cell behaviors driving zebrafish convergence and extension gastrulation movements. *J Cell Biol* **169**, 777-787.
- Lin X, Voyno-Yasenetskaya TA, Hooley R, Lin CY, Orłowski J & Barber DL. (1996). Galpha12 differentially regulates Na⁺-H⁺ exchanger isoforms. *J Biol Chem* **271**, 22604-22610.
- Linsdell P. (2006). Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp Physiol* **91**, 123-129.
- Linsdell P, Evagelidis A & Hanrahan JW. (2000). Molecular determinants of anion selectivity in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *Biophys J* **78**, 2973-2982.
- Liu CY & Kaufman RJ. (2003). The unfolded protein response. *J Cell Sci* **116**, 1861-1862.
- Liu Y, Choudhury P, Cabral CM & Sifers RN. (1999). Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J Biol Chem* **274**, 5861-5867.
- Loo MA, Jensen TJ, Cui L, Hou Y, Chang XB & Riordan JR. (1998). Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J* **17**, 6879-6887.
- Loo TW, Bartlett MC & Clarke DM. (2008). Processing mutations disrupt interactions between the nucleotide binding and transmembrane domains of P-glycoprotein and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* **283**, 28190-28197.
- Loo TW & Clarke DM. (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**, 32373-32376.
- Loussouarn G, Demolombe S, Mohammad-Panah R, Escande D & Baró I. (1996). Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am J Physiol* **271**, C1565-1573.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL & RANDALL RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lu C, Jiang C, Pribanic S & Rotin D. (2007). CFTR stabilizes ENaC at the plasma membrane. *J Cyst Fibros* **6**, 419-422.
- Lu M, Leng Q, Egan ME, Caplan MJ, Boulpaep EL, Giebisch GH & Hebert SC. (2006). CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J Clin Invest* **116**, 797-807.
- Lukacs GL, Chang XB, Bear C, Kartner N, Mohamed A, Riordan JR & Grinstein S. (1993). The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J Biol Chem* **268**, 21592-21598.
- Lukacs GL, Mohamed A, Kartner N, Chang XB, Riordan JR & Grinstein S. (1994). Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J* **13**, 6076-6086.
- Lukacs GL, Segal G, Kartner N, Grinstein S & Zhang F. (1997). Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochem J* **328** (Pt 2), 353-361.
- Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, Rumenapp U, Jakobs KH, Schmidt M & Wieland T. (2005). The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem* **280**, 11134-11139.



- Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W & Huang XY. (2000). Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* **102**, 635-646.
- Madara JL. (1987). Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *Am J Physiol* **253**, C171-175.
- Maeda O, Usami N, Kondo M, Takahashi M, Goto H, Shimokata K, Kusugami K & Sekido Y. (2004). Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. *Oncogene* **23**, 964-972.
- 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, Kuehr 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**, G709-716.
- Mall M, Hipper A, Greger R & Kunzelmann K. (1996). Wild type but not deltaF508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* **381**, 47-52.
- Mancini R, Aebi M & Helenius A. (2003). Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y in mammalian cells. *J Biol Chem* **278**, 46895-46905.
- Marinissen MJ, Servitja JM, Offermanns S, Simon MI & Gutkind JS. (2003). Thrombin protease-activated receptor-1 signals through Gq- and G13-initiated MAPK cascades regulating c-Jun expression to induce cell transformation. *J Biol Chem* **278**, 46814-46825.
- Marrari Y, Crouthamel M, Irannejad R & Wedegaertner PB. (2007). Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* **46**, 7665-7677.
- Martin CB, Mahon GM, Klinger MB, Kay RJ, Symons M, Der CJ & Whitehead IP. (2001). The thrombin receptor, PAR-1, causes transformation by activation of Rho-mediated signaling pathways. *Oncogene* **20**, 1953-1963.
- Maruyama Y, Nishida M, Sugimoto Y, Tanabe S, Turner JH, Kozasa T, Wada T, Nagao T & Kurose H. (2002). Galpha(12/13) mediates alpha(1)-adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* **91**, 961-969.
- Mary S, Charrasse S, Meriane M, Comunale F, Travo P, Blangy A & Gauthier-Rouvière C. (2002). Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism. *Mol Biol Cell* **13**, 285-301.
- Masters SB, Miller RT, Chi MH, Chang FH, Beiderman B, Lopez NG & Bourne HR. (1989). Mutations in the GTP-binding site of GS alpha alter stimulation of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **264**, 15467-15474.
- McCann JD & Welsh MJ. (1990). Regulation of Cl⁻ and K⁺ channels in airway epithelium. *Annu Rev Physiol* **52**, 115-135.
- McNeil E, Capaldo CT & Macara IG. (2006). Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* **17**, 1922-1932.
- McNicholas CM, Yang Y, Giebisch G & Hebert SC. (1996). Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K⁺ channel (ROMK2). *Am J Physiol* **271**, F275-285.
- Meacham GC, Lu Z, King S, Sorscher E, Tousson A & Cyr DM. (1999). The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J* **18**, 1492-1505.
- Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM & Cyr DM. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* **3**, 100-105.
- Meigs TE, Fedor-Chaiken M, Kaplan DD, Brackenbury R & Casey PJ. (2002). Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. *J Biol Chem* **277**, 24594-24600.
- Meigs TE, Fields TA, McKee DD & Casey PJ. (2001). Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 519-524.
- Melikian HE, Ramamoorthy S, Tate CG & Blakely RD. (1996). Inability to N-glycosylate the human norepinephrine transporter reduces protein stability, surface trafficking, and transport activity but not ligand recognition. *Mol Pharmacol* **50**, 266-276.
- Merkel OM, Zheng M, Debus H & Kissel TH. (2011). Pulmonary gene delivery using polymeric non-viral vectors. *Bioconjug Chem*.
- Meyer TN, Hunt J, Schwesinger C & Denker BM. (2003). Galpha12 regulates epithelial cell junctions through Src tyrosine kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C1281-1293.
- Meyer TN, Schwesinger C & Denker BM. (2002). Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. Galpha(12) directly binds to the Src homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 24855-24858.

- Mickler M, Hessling M, Ratzke C, Buchner J & Hugel T. (2009). The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 281-286.
- Milligan G & Kostenis E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S46-55.
- Milligan G, Mullaney I & Mitchell FM. (1992). Immunological identification of the alpha subunit of G13, a novel guanine nucleotide binding protein. *FEBS Lett* **297**, 186-188.
- Mitra N, Sinha S, Ramya TN & Surolia A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci* **31**, 156-163.
- Mittal R, Ahmadian MR, Goody RS & Wittinghofer A. (1996). Formation of a transition-state analog of the Ras GTPase reaction by Ras-GDP, tetrafluoroaluminate, and GTPase-activating proteins. *Science* **273**, 115-117.
- Moers A, Nieswandt B, Massberg S, Wettschreck N, Grüner S, Konrad I, Schulte V, Aktas B, Gratacap MP, Simon MI, Gawaz M & Offermanns S. (2003). G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis. *Nat Med* **9**, 1418-1422.
- Moers A, Nürnberg A, Goebbels S, Wettschreck N & Offermanns S. (2008). Galpha12/Galpha13 deficiency causes localized overmigration of neurons in the developing cerebral and cerebellar cortices. *Mol Cell Biol* **28**, 1480-1488.
- Mohammad-Panah R, Demolombe S, Riochet D, Leblais V, Loussouarn G, Pollard H, Baró I & Escande D. (1998). Hyperexpression of recombinant CFTR in heterologous cells alters its physiological properties. *Am J Physiol* **274**, C310-318.
- Montserrat C, Merten M & Figarella C. (1996). Defective ATP-dependent mucin secretion by cystic fibrosis pancreatic epithelial cells. *FEBS Lett* **393**, 264-268.
- Morales MM, Carroll TP, Morita T, Schwiebert EM, Devuyst O, Wilson PD, Lopes AG, Stanton BA, Dietz HC, Cutting GR & Guggino WB. (1996). Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am J Physiol* **270**, F1038-1048.
- Morelli X, Bourgeas R & Roche P. (2011). Chemical and structural lessons from recent successes in protein-protein interaction inhibition (2P2I). *Curr Opin Chem Biol* **15**, 475-481.
- Mori K, Sant A, Kohno K, Normington K, Gething MJ & Sambrook JF. (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**, 2583-2593.
- Mosesson Y, Mills GB & Yarden Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 835-850.
- Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Gibson RL, Marshall SG & Cutting GR. (2008). Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med* **10**, 851-868.
- Moyer BD, Duhaime M, Shaw C, Denton J, Reynolds D, Karlson KH, Pfeiffer J, Wang S, Mickle JE, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Li M & Stanton BA. (2000). The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *J Biol Chem* **275**, 27069-27074.
- Mukherjee S, Ghosh RN & Maxfield FR. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* **77**, 759-803.



- Nagel G, Szellas T, Riordan JR, Friedrich T & Hartung K. (2001). Non-specific activation of the epithelial sodium channel by the CFTR chloride channel. *EMBO Rep* **2**, 249-254.
- Nakagawa M, Fukata M, Yamaga M, Itoh N & Kaibuchi K. (2001). Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci* **114**, 1829-1838.
- Nakatsukasa K & Brodsky JL. (2008). The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* **9**, 861-870.
- Nanua S, Sajjan U, Keshavjee S & Hershenson MB. (2006). Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **343**, 135-143.
- Naren AP, Cobb B, Li C, Roy K, Nelson D, Heda GD, Liao J, Kirk KL, Sorscher EJ, Hanrahan J & Clancy JP. (2003). A macromolecular complex of beta 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 342-346.
- Naren AP, Cormet-Boyaka E, Fu J, Villain M, Blalock JE, Quick MW & Kirk KL. (1999). CFTR chloride channel regulation by an interdomain interaction. *Science* **286**, 544-548.
- Naren AP, Nelson DJ, Xie W, Jovov B, Pevsner J, Bennett MK, Benos DJ, Quick MW & Kirk KL. (1997). Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. *Nature* **390**, 302-305.

- Naren AP, Quick MW, Collawn JF, Nelson DJ & Kirk KL. (1998). Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10972-10977.
- Neer EJ. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-257.
- Neri AS, Lori I, Taccetti G, Festini F, de Martino M, Masi L & Brandi ML. (2006). Alteration of bone mineral density in cystic fibrosis adults. *Chest* **130**, 1952-1953; author reply 1953.
- Neves SR, Ram PT & Iyengar R. (2002). G protein pathways. *Science* **296**, 1636-1639.
- Ng DT, Spear ED & 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**, 77-88.
- Niessen CM. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* **127**, 2525-2532.
- Nikolay R, Wiederkehr T, Rist W, Kramer G, Mayer MP & Bukau B. (2004). Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J Biol Chem* **279**, 2673-2678.
- Nilsson HE, Dragomir A, Lazorova L, Johannesson M & Roomans GM. (2010). CFTR and tight junctions in cultured bronchial epithelial cells. *Exp Mol Pathol* **88**, 118-127.
- Niu J, Vaiskunaitė R, Suzuki N, Kozasa T, Carr DW, Dulin N & Voino-Yasenetskaya TA. (2001). Interaction of heterotrimeric G13 protein with an A-kinase-anchoring protein 110 (AKAP110) mediates cAMP-independent PKA activation. *Curr Biol* **11**, 1686-1690.
- Nollet F, Kools P & van Roy F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* **299**, 551-572.
- Norez C, Bilan F, Kitzis A, Mettey Y & Becq F. (2008). Proteasome-dependent pharmacological rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator revealed by mutation of glycine 622. *J Pharmacol Exp Ther* **325**, 89-99.
- Norez C, Noel S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, DeJonge H & Becq F. (2006). Rescue of functional Δ F508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett* **580**, 2081-2086.
- Nose A, Nagafuchi A & Takeichi M. (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* **54**, 993-1001.
- Nose A & Takeichi M. (1986). A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* **103**, 2649-2658.
- Nusrat A, Chen JA, Foley CS, Liang TW, Tom J, Cromwell M, Quan C & Mersny RJ. (2000). The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* **275**, 29816-29822.



- Oberdorf J, Carlson EJ & Skach WR. (2001). Redundancy of mammalian proteasome beta subunit function during endoplasmic reticulum associated degradation. *Biochemistry* **40**, 13397-13405.
- Offermanns S. (2001). In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in Galpha-deficient mice. *Oncogene* **20**, 1635-1642.
- Offermanns S, Hu YH & Simon MI. (1996). Galpha12 and galpha13 are phosphorylated during platelet activation. *J Biol Chem* **271**, 26044-26048.
- Offermanns S, Mancino V, Revel JP & Simon MI. (1997). Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. *Science* **275**, 533-536.
- 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**, 445-450.
- Okiyonedo T, Barrière H, Bagdány M, Rabeh WM, Du K, Höhfeld J, Young JC & Lukacs GL. (2010). Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science* **329**, 805-810.
- Okiyonedo T, Harada K, Takeya M, Yamahira K, Wada I, Shuto T, Suico MA, Hashimoto Y & Kai H. (2004). Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol Biol Cell* **15**, 563-574.
- Okiyonedo T, Niibori A, Harada K, Kohno T, Michalak M, Duszyk M, Wada I, Ikawa M, Shuto T, Suico MA & Kai H. (2008). Role of calnexin in the ER quality control and productive folding of CFTR; differential effect of calnexin knockout on wild-type and DeltaF508 CFTR. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 1585-1594.
- Oliver JD, van der Wal FJ, Bulleid NJ & High S. (1997). Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* **275**, 86-88.

- Oppenheimer EA, Case AL, Esterly JR & Rothberg RM. (1970). Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility. *Am J Obstet Gynecol* **108**, 673-674.
- Oppenheimer EH & Esterly JR. (1975). Pathology of cystic fibrosis review of the literature and comparison with 146 autopsied cases. *Perspect Pediatr Pathol* **2**, 241-278.
- Ostedgaard LS, Randak C, Rokhlina T, Karp P, Vermeer D, Ashbourne Excoffon KJ & Welsh MJ. (2003). Effects of C-terminal deletions on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in cystic fibrosis airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1937-1942.
- Ozawa M, Baribault H & Kemler R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* **8**, 1711-1717.



- Paccou J, Zeboulon N, Combesure C, Gossec L & Cortet B. (2010). The prevalence of osteoporosis, osteopenia, and fractures among adults with cystic fibrosis: a systematic literature review with meta-analysis. *Calcif Tissue Int* **86**, 1-7.
- Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R, Cramer R, Mollapour M, Workman P, Piper PW, Pearl LH & Prodromou C. (2002). Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell* **10**, 1307-1318.
- Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jerónimo C, Milanezi F & Schmitt FC. (2005). P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res* **11**, 5869-5877.
- Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, Albergaria A, Milanezi F & Schmitt FC. (2007). P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res* **9**, 214.
- Parodi AJ. (2000). Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J* **348 Pt 1**, 1-13.
- Pasyk EA & Foskett JK. (1995). Mutant (delta F508) cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl-channel is functional when retained in endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* **270**, 12347-12350.
- Patel SD, Ciatto C, Chen CP, Bahna F, Rajebhosale M, Arkus N, Schieren I, Jessell TM, Honig B, Price SR & Shapiro L. (2006). Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* **124**, 1255-1268.
- Pece S, Chiariello M, Murga C & Gutkind JS. (1999). Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* **274**, 19347-19351.
- Peifer M, McCrean PD, Green KJ, Wieschaus E & Gumbiner BM. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* **118**, 681-691.
- Pelham HR. (1997). Membrane transport. Green light for Golgi traffic. *Nature* **389**, 17, 19.
- Picciano JA, Ameen N, Grant BD & Bradbury NA. (2003). Rme-1 regulates the recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C1009-1018.
- Pier G, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn S, Banting G, Ratcliff R, Evans M & Colledge W. (1998). Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* **393**, 79-82.
- Pier GB, Grout M & Zaidi TS. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of Pseudomonas aeruginosa from the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12088-12093.
- Pietrement C, Da Silva N, Silberstein C, James M, Marsolais M, Van Hoek A, Brown D, Pastor-Soler N, Ameen N, Laprade R, Ramesh V & Breton S. (2008). Role of NHERF1, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, and cAMP in the regulation of aquaporin 9. *J Biol Chem* **283**, 2986-2996.
- Pind S, Riordan JR & Williams DB. (1994). Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **269**, 12784-12788.
- Pokutta S, Drees F, Yamada S, Nelson WJ & Weis WI. (2008). Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts. *Biochem Soc Trans* **36**, 141-147.
- Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R & Engel J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* **223**, 1019-1026.
- Ponimaskin E, Behn H, Adarichev V, Voyno-Yasenetskaya TA, Offermanns S & Schmidt MF. (2000). Acylation of Galpha(13) is important for its interaction with thrombin receptor, transforming activity and actin stress fiber formation. *FEBS Lett* **478**, 173-177.

- Porfiri E, Rubinfeld B, Albert I, Hovanes K, Waterman M & Polakis P. (1997). Induction of a beta-catenin-LEF-1 complex by wnt-1 and transforming mutants of beta-catenin. *Oncogene* **15**, 2833-2839.
- Powell DW. (1981). Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* **241**, G275-288.
- Prince LS, Peter K, Hatton SR, Zaliauskiene L, Cotlin LF, Clancy JP, Marchase RB & Collawn JF. (1999). Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal. *J Biol Chem* **274**, 3602-3609.
- Prince LS, Workman RB & Marchase RB. (1994). Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5192-5196.



- Quinton P. (1982). Suggestion of an abnormal anion exchange mechanism in sweat glands of cystic fibrosis patients. *Pediatr Res* **16**, 533-537.
- Quinton P. (1983). Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* **301**, 421-422.



- Rab A, Bartoszewski R, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Collawn JF & Bebok Z. (2007). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C756-766.
- Radhika V & Dhanasekaran N. (2001). Transforming G proteins. *Oncogene* **20**, 1607-1614.
- Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M & Hynes RO. (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* **181**, 64-78.
- Raghuram V, Mak DO & Foskett JK. (2001). Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1300-1305.
- Ramjeesingh M, Li C, Kogan I, Wang Y, Huan LJ & Bear CE. (2001). A monomer is the minimum functional unit required for channel and ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* **40**, 10700-10706.
- Ramphal R, McNiece MT & Polack FM. (1981). Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to the injured cornea: a step in the pathogenesis of corneal infections. *Ann Ophthalmol* **13**, 421-425.
- Raw AS, Coleman DE, Gilman AG & Sprang SR. (1997). Structural and biochemical characterization of the GTPgammaS-, GDP.Pi-, and GDP-bound forms of a GTPase-deficient Gly42 --> Val mutant of Galpha1. *Biochemistry* **36**, 15660-15669.
- Reddy MM & Quinton PM. (2003). Functional interaction of CFTR and ENaC in sweat glands. *Pflugers Arch* **445**, 499-503.
- Reddy MM & Quinton PM. (2005). ENaC activity requires CFTR channel function independently of phosphorylation in sweat duct. *J Membr Biol* **207**, 23-33.
- Reddy MM, Sun D & Quinton PM. (2001). Apical heterotrimeric g-proteins activate CFTR in the native sweat duct. *J Membr Biol* **179**, 51-61.
- Rehm A & Ploegh HL. (1997). Assembly and intracellular targeting of the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins. *J Cell Biol* **137**, 305-317.
- Reigada D & Mitchell CH. (2005). Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C132-140.
- Reiniger N, Lee MM, Coleman FT, Ray C, Golan DE & Pier GB. (2007). Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection requires cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modulated interleukin-1 (IL-1) release and signaling through the IL-1 receptor. *Infect Immun* **75**, 1598-1608.
- Rennolds J, Boyaka PN, Bellis SL & Cormet-Boyaka E. (2008). Low temperature induces the delivery of mature and immature CFTR to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **366**, 1025-1029.
- Ribeiro AS, Albergaria A, Sousa B, Correia AL, Bracke M, Seruca R, Schmitt FC & Paredes J. (2010). Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. *Oncogene* **29**, 392-402.
- Ridley AJ. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* **114**, 2713-2722.
- Riobo NA & Manning DR. (2005). Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 146-154.
- Riordan JR. (2005). Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* **67**, 701-718.
- Riordan JR. (2008). CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* **77**, 701-726.

- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N & Chou JL. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.
- Robertson J & Macdonald K. (2010). Prevalence of bone loss in a population with cystic fibrosis. *Br J Nurs* **19**, 636-639.
- Rojas RJ, Yohe ME, Gershburg S, Kawano T, Kozasa T & Sondek J. (2007). Galphag directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **282**, 29201-29210.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D & Hidaka N. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**, 1059-1065.
- Roof DJ, Applebury ML & Sternweis PC. (1985). Relationships within the family of GTP-binding proteins isolated from bovine central nervous system. *J Biol Chem* **260**, 16242-16249.
- Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC & Riordan JR. (2004). Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* **279**, 39051-39057.
- Rosenstein BJ & Langbaum TS. (1983). Incidence of distal intestinal obstruction syndrome in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2**, 299-301.
- Rosser MF, Grove DE, Chen L & Cyr DM. (2008). Assembly and misassembly of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: folding defects caused by deletion of F508 occur before and after the calnexin-dependent association of membrane spanning domain (MSD) 1 and MSD2. *Mol Biol Cell* **19**, 4570-4579.
- Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z & Crystal RG. (1993). Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* **75**, 2419-2424.
- Roychowdhury S & Rasenick MM. (2008). Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of microtubule assembly by heterotrimeric Gproteins. *FEBS J* **275**, 4654-4663.
- Rubenstein RC, Egan ME & Zeitlin PL. (1997). In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest* **100**, 2457-2465.
- Rubenstein RC & Lyons BM. (2001). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates HSC70 expression by facilitating mRNA degradation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L43-51.
- Rubenstein RC & Zeitlin PL. (2000). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C259-267.
- Rubtsov A, Strauch P, Digiacoimo A, Hu J, Pelanda R & Torres RM. (2005). Lsc regulates marginal-zone B cell migration and adhesion and is required for the IgM T-dependent antibody response. *Immunity* **23**, 527-538.
- Ruknudin A, Schulze DH, Sullivan SK, Lederer WJ & Welling PA. (1998). Novel subunit composition of a renal epithelial KATP channel. *J Biol Chem* **273**, 14165-14171.
- Rutkowski DT & Kaufman RJ. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* **14**, 20-28.



- Sabath E, Negoro H, Beaudry S, Paniagua M, Angelow S, Shah J, Grammatikakis N, Yu AS & Denker BM. (2008). Galphai2 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly. *J Cell Sci* **121**, 814-824.
- Sadlish H & Skach WR. (2004). Biogenesis of CFTR and other polytopic membrane proteins: new roles for the ribosome-translocon complex. *J Membr Biol* **202**, 115-126.
- Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA & Brown JH. (2000). The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 459-489.
- Saha C, Nigam SK & Denker BM. (1998). Involvement of Galphai2 in the maintenance and biogenesis of epithelial cell tight junctions. *J Biol Chem* **273**, 21629-21633.
- Sahai E & Marshall CJ. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 133-142.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T & Tsukita S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* **11**, 4131-4142.
- Salomon D, Ayalon O, Patel-King R, Hynes RO & Geiger B. (1992). Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci* **102** (Pt 1), 7-17.
- Sarma T, Voyno-Yasenetskaya T, Hope TJ & Rasenick MM. (2003). Heterotrimeric G-proteins associate with microtubules during differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. *FASEB J* **17**, 848-859.

- Sato S, Ward CL & Kopito RR. (1998). Cotranslational ubiquitination of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in vitro. *J Biol Chem* **273**, 7189-7192.
- Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ & Kopito RR. (1996). Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* **271**, 635-638.
- Sawano H, Koumoto Y, Ohta K, Sasaki Y, Segawa S & Tachibana H. (1992). Efficient in vitro folding of the three-disulfide derivatives of hen lysozyme in the presence of glycerol. *FEBS Lett* **303**, 11-14.
- Saxena SK & Kaur S. (2006a). Rab27a negatively regulates CFTR chloride channel function in colonic epithelia: involvement of the effector proteins in the regulatory mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 259-267.
- Saxena SK & Kaur S. (2006b). Regulation of epithelial ion channels by Rab GTPases. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 582-587.
- Saxena SK, Kaur S & George C. (2006a). Rab4GTPase modulates CFTR function by impairing channel expression at plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 184-191.
- Saxena SK, Singh M, Shibata H, Kaur S & George C. (2006b). Rab4 GTP/GDP modulates amiloride-sensitive sodium channel (ENaC) function in colonic epithelia. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 726-733.
- Schekman R & Orci L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533.
- Schneider C, Sepp-Lorenzino L, Nimmesgern E, Ouerfelli O, Danishefsky S, Rosen N & Hartl FU. (1996). Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14536-14541.
- Schrag JD, Bergeron JJ, Li Y, Borisova S, Hahn M, Thomas DY & Cygler M. (2001). The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell* **8**, 633-644.
- Schreiber R, Greger R, Nitschke R & Kunzelmann K. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* **434**, 841-847.
- Schreiber R, Hopf A, Mall M, Greger R & Kunzelmann K. (1999a). The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5310-5315.
- Schreiber R, Nitschke R, Greger R & Kunzelmann K. (1999b). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J Biol Chem* **274**, 11811-11816.
- Schroeder TH, Lee MM, Yacono PW, Cannon CL, Gerçeker AA, Golan DE & Pier GB. (2002). CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6907-6912.
- Schröder M & Kaufman RJ. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739-789.
- Schwarzenberg SJ, Thomas W, Olsen TW, Grover T, Walk D, Milla C & Moran A. (2007). Microvascular complications in cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes Care* **30**, 1056-1061.
- Schweizer A, Ericsson M, Bächli T, Griffiths G & Hauri HP. (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), 671-683.
- Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ & Guggino WB. (1999). CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* **79**, S145-166.
- Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR & Guggino WB. (1995). CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* **81**, 1063-1073.
- Schwiebert EM, Flotte T, Cutting GR & Guggino WB. (1994). Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell chloride currents. *Am J Physiol* **266**, C1464-1477.
- Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME & Guggino WB. (1998). Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2674-2679.
- Schwindinger WF & Robishaw JD. (2001). Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**, 1653-1660.
- Seibert FS, Loo TW, Clarke DM & Riordan JR. (1997). Cystic fibrosis: channel, catalytic, and folding properties of the CFTR protein. *J Bioenerg Biomembr* **29**, 429-442.
- Seidler U, Blumenstein I, Kretz A, Viellard-Baron D, Rossmann H, Colledge WH, 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), 411-423.
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grübel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR & Hendrickson WA. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* **374**, 327-337.
- Shapiro L & Weis WI. (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a003053.
- Sharma GD. (2010). Cystic Fibrosis. <http://www.emedicine.com>.

- Sharma M, Benharouga M, Hu W & Lukacs GL. (2001). Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. *J Biol Chem* **276**, 8942-8950.
- Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, Bache KG, Papsin B, Zerangue N, Stenmark H & Lukacs GL. (2004). Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol* **164**, 923-933.
- 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**, 99-111.
- Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE & Welsh MJ. (1993). Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* **362**, 160-164.
- Sheppard DN & Robinson KA. (1997). Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a murine cell line. *J Physiol* **503 (Pt 2)**, 333-346.
- Sheth HB, Lee KK, Wong WY, Srivastava G, Hindsgaul O, Hodges RS, Paranchych W & Irvin RT. (1994). The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence beta GalNAc(1-4)beta Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2. *Mol Microbiol* **11**, 715-723.
- Shimizu T, Kagawa T, Inoue T, Nonaka A, Takada S, Aburatani H & Taga T. (2008). Stabilized beta-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Biol* **28**, 7427-7441.
- Shimoyama Y, Yoshida T, Terada M, Shimosato Y, Abe O & Hirohashi S. (1989). Molecular cloning of a human Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues. *J Cell Biol* **109**, 1787-1794.
- Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ & Milgram SL. (1998). An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* **273**, 19797-19801.
- Singh AK, Riederer B, Chen M, Xiao F, Krabbenhöft A, Engelhardt R, Nylander O, Soleimani M & Seidler U. (2010). The switch of intestinal Slc26 exchangers from anion absorptive to HCO₃⁻ secretory mode is dependent on CFTR anion channel function. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C1057-1065.
- Sivasankar S, Gumbiner B & Leckband D. (2001). Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J* **80**, 1758-1768.
- Smith SS, Liu X, Zhang ZR, Sun F, Kriewall TE, McCarty NA & Dawson DC. (2001). CFTR: covalent and noncovalent modification suggests a role for fixed charges in anion conduction. *J Gen Physiol* **118**, 407-431.
- Sood R, Porter AC, Ma K, Quilliam LA & Wek RC. (2000). Pancreatic eukaryotic initiation factor-2alpha kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J* **346 Pt 2**, 281-293.
- Spicher K, Kalkbrenner F, Zobel A, Harhammer R, Nürnberg B, Söling A & Schultz G. (1994). G12 and G13 alpha-subunits are immunochemically detectable in most membranes of various mammalian cells and tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 906-914.
- Steagall WK & Drumm ML. (1999). Stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent short-circuit currents across DeltaF508 murine intestines. *Gastroenterology* **116**, 1379-1388.
- Stehbens SJ, Akhmanova A & Yap AS. (2009). Microtubules and cadherins: a neglected partnership. *Front Biosci* **14**, 3159-3167.
- Stehbens SJ, Paterson AD, Crampton MS, Shewan AM, Ferguson C, Akhmanova A, Parton RG & Yap AS. (2006). Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J Cell Sci* **119**, 1801-1811.
- Stepniak E, Radice GL & Vasioukhin V. (2009). Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a002949.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS & Goodenough DA. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* **103**, 755-766.
- STOKER M & MACPHERSON I. (1964). SYRIAN HAMSTER FIBROBLAST CELL LINE BHK21 AND ITS DERIVATIVES. *Nature* **203**, 1355-1357.
- Stratford FL, Pereira MM, Becq F, McPherson MA & Dormer RL. (2003). Benzo(c)quinolizinium drugs inhibit degradation of Delta F508-CFTR cytoplasmic domain. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 524-530.
- Strickland E, Qu BH, Millen L & Thomas PJ. (1997). The molecular chaperone Hsc70 assists the in vitro folding of the N-terminal nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **272**, 25421-25424.
- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC & Boucher RC. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**, 847-850.

- Sugden PH & Clerk A. (1998). "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* **83**, 345-352.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R & Brunger AT. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-353.
- Suzuki N, Nakamura S, Mano H & Kozasa T. (2003). Gα₁₂ activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 733-738.
- Swanson J. (2006). CFTR: helping to acidify macrophage lysosomes. *Nat Cell Biol* **8**, 908-909.
- Swiatecka-Urban A, Brown A, Moreau-Marquis S, Renuka J, Coutermarsh B, Barnaby R, Karlson KH, Flotte TR, Fukuda M, Langford GM & Stanton BA. (2005). The short apical membrane half-life of rescued {Δ}F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of {Δ}F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells. *J Biol Chem* **280**, 36762-36772.
- Swiatecka-Urban A, Duhaime M, Coutermarsh B, Karlson KH, Collawn J, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Langford G & Stanton BA. (2002). PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **277**, 40099-40105.
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P & Rothman JE. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324.



- Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR & Hanrahan JW. (1991). Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* **352**, 628-631.
- Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR & Hanrahan JW. (1993). Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature* **366**, 79-82.
- Takai Y, Sasaki T & Matozaki T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.
- Takeichi M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* **59**, 237-252.
- Takeichi M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 619-627.
- Tam R & Saier MH. (1993). Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 320-346.
- Tamada T, Hug MJ, Frizzell RA & Bridges RJ. (2001). Microelectrode and impedance analysis of anion secretion in Calu-3 cells. *JOP* **2**, 219-228.
- Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR & Shapiro L. (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* **20**, 1153-1163.
- Tepass U. (1999). Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 540-548.
- Tesmer VM, Kawano T, Shankaranarayanan A, Kozasa T & Tesmer JJ. (2005). Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Gα₁₂-GRK2-Gβγ complex. *Science* **310**, 1686-1690.
- Thelin WR, Chen Y, Gentsch M, Kreda SM, Sallee JL, Scarlett CO, Borchers CH, Jacobson K, Stutts MJ & Milgram SL. (2007). Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J Clin Invest* **117**, 364-374.
- Thelin WR, Kesimer M, Tarran R, Kreda SM, Grubb BR, Sheehan JK, Stutts MJ & Milgram SL. (2005). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is regulated by a direct interaction with the protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **280**, 41512-41520.
- Tirasophon W, Welihinda AA & Kaufman RJ. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* **12**, 1812-1824.
- Tortorella D, Story CM, Huppa JB, Wiertz EJ, Jones TR, Bacik I, Bennink JR, Yewdell JW & Ploegh HL. (1998). Dislocation of type I membrane proteins from the ER to the cytosol is sensitive to changes in redox potential. *J Cell Biol* **142**, 365-376.
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS & Walter P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-258.
- Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D & Plavsic N. (1985). Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* **230**, 1054-1057.
- Turner JR. (2006). Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* **169**, 1901-1909.



- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S & Furuse M. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* **126**, 741-754.
- Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M & Tsukita S. (2004). Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* **279**, 44785-44794.
- Urade R, Takenaka Y & Kito M. (1993). Protein degradation by ERp72 from rat and mouse liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **268**, 22004-22009.
- Urano F, Bertolotti A & Ron D. (2000). IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **113 Pt 21**, 3697-3702.
- Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR & Alexander RW. (1998). Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem* **273**, 19772-19777.



- Vaiskunaite R, Kozasa T & Voyno-Yasenetskaya TA. (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**, 46088-46093.
- van den Berg JM, Morton AM, Kok SW, Pijl H, Conway SP & Heijerman HG. (2008). Microvascular complications in patients with cystic fibrosis-related diabetes (CFRD). *J Cyst Fibros* **7**, 515-519.
- Varga K, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Hong JS, Guimbellot JS, Venglarik CJ, Niraj A, Mazur M, Sorscher EJ, Collawn JF & Bebök Z. (2004). Efficient intracellular processing of the endogenous cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in epithelial cell lines. *J Biol Chem* **279**, 22578-22584.
- Verkman AS. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* **118**, 3225-3232.
- Vincent PA, Xiao K, Buckley KM & Kowalczyk AP. (2004). VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C987-997.
- Voyno-Yasenetskaya TA, Pace AM & Bourne HR. (1994). Mutant alpha subunits of G12 and G13 proteins induce neoplastic transformation of Rat-1 fibroblasts. *Oncogene* **9**, 2559-2565.



- 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**, 5420-5432.
- Wada I, Rindress D, Cameron PH, Ou WJ, Doherty JJ, Louvard D, Bell AW, Dignard D, Thomas DY & Bergeron JJ. (1991). SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **266**, 19599-19610.
- Wakita H, Shirahama S & Furukawa F. (1998). Distinct P-cadherin expression in cultured normal human keratinocytes and squamous cell carcinoma cell lines. *Microsc Res Tech* **43**, 218-223.
- Wang F, Zeltwanger S, Hu S & Hwang TC. (2000a). Deletion of phenylalanine 508 causes attenuated phosphorylation-dependent activation of CFTR chloride channels. *J Physiol* **524 Pt 3**, 637-648.
- Wang S, Raab RW, Schatz PJ, Guggino WB & Li M. (1998a). Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett* **427**, 103-108.
- Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB & Li M. (2000b). Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* **103**, 169-179.
- Wang X, Matteson J, An Y, Moyer B, Yoo JS, Bannykh S, Wilson IA, Riordan JR & Balch WE. (2004). COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol* **167**, 65-74.
- Wang X, Venable J, LaPointe P, Hutt DM, Koulov AV, Coppinger J, Gurkan C, Kellner W, Matteson J, Plutner H, Riordan JR, Kelly JW, Yates JR & Balch WE. (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* **127**, 803-815.
- Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M & Ron D. (1998b). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* **17**, 5708-5717.

- Wang Y, Ho G, Zhang JJ, Nieuwenhuijsen B, Edris W, Chanda PK & Young KH. (2002). Regulator of G protein signaling Z1 (RGSZ1) interacts with Galpha i subunits and regulates Galpha i-mediated cell signaling. *J Biol Chem* **277**, 48325-48332.
- Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ & Prywes R. (2000c). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* **275**, 27013-27020.
- Ward CL & Kopito RR. (1994). Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* **269**, 25710-25718.
- Ward CL, Omura S & Kopito RR. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121-127.
- Ware FE, Vassilakos A, Peterson PA, Jackson MR, Lehrman MA & Williams DB. (1995). The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem* **270**, 4697-4704.
- Waterman-Storer CM, Salmon WC & Salmon ED. (2000). Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells. *Mol Biol Cell* **11**, 2471-2483.
- Waxman L, Fagan JM & Goldberg AL. (1987). Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **262**, 2451-2457.
- Wegele H, Müller L & Buchner J. (2004). Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **151**, 1-44.
- Wegele H, Wandinger SK, Schmid AB, Reinstein J & Buchner J. (2006). Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90. *J Mol Biol* **356**, 802-811.
- Wei X, Eisman R, Xu J, Harsch AD, Mulberg AE, Bevins CL, Glick MC & Scanlin TF. (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**, 373-384.
- Weiser N, Molenda N, Urbanova K, Bähler M, Pieper U, Oberleithner H & Schillers H. (2011). Paracellular permeability of bronchial epithelium is controlled by CFTR. *Cell Physiol Biochem* **28**, 289-296.
- Weixel KM & Bradbury NA. (2000). The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J Biol Chem* **275**, 3655-3660.
- Weixel KM & Bradbury NA. (2001). Mu 2 binding directs the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the clathrin-mediated endocytic pathway. *J Biol Chem* **276**, 46251-46259.
- Wells CD, Liu MY, Jackson M, Gutowski S, Sternweis PM, Rothstein JD, Kozasa T & Sternweis PC. (2002). Mechanisms for reversible regulation between G13 and Rho exchange factors. *J Biol Chem* **277**, 1174-1181.
- Welsh M, Ramsey B, Accurso F & Cutting G. (2001). Cystic fibrosis. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. C.L. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, and D. Valle, editors, pp. 3799-3876. McGraw-Hill, New York, USA.
- Welsh M & Smith A. (1995). Cystic fibrosis. *Sci Am* **273**, 52-59.
- Welsh MJ & Smith AE. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**, 1251-1254.
- Wess J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J* **11**, 346-354.
- Weyler RT, Yurko-Mauro KA, Rubenstein R, Kollen WJ, Reenstra W, Altschuler SM, Egan M & Mulberg AE. (1999). CFTR is functionally active in GnRH-expressing GT1-7 hypothalamic neurons. *Am J Physiol* **277**, C563-571.
- Whitehead IP, Khosravi-Far R, Kirk H, Trigo-Gonzalez G, Der CJ & Kay R. (1996). Expression cloning of Isc, a novel oncogene with structural similarities to the Dbl family of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* **271**, 18643-18650.
- Williams EJ, Furness J, Walsh FS & Doherty P. (1994). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* **13**, 583-594.
- Willumsen NJ & Boucher RC. (1989). Shunt resistance and ion permeabilities in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol* **256**, C1054-1063.
- Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wetschurck N, Gorbey S, Orsy P, Horváth B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schütz G, Gutkind JS & Offermanns S. (2008). G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med* **14**, 64-68.
- Wittchen ES, Haskins J & Stevenson BR. (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* **274**, 35179-35185.
- Wong V. (1997). Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *Am J Physiol* **273**, C1859-1867.



- Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V & Kowalczyk AP. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* **163**, 535-545.
- Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, Dejana E, Faundez V & Kowalczyk AP. (2005). p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell* **16**, 5141-5151.
- Xiong X, Chong E & Skach WR. (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**, 2616-2624.



- Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI & Nelson WJ. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**, 889-901.
- Yamaguchi Y, Katoh H, Mori K & Negishi M. (2002). Galpha(12) and Galpha(13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. *Curr Biol* **12**, 1353-1358.
- Yamaguchi Y, Katoh H & Negishi M. (2003). N-terminal short sequences of alpha subunits of the G12 family determine selective coupling to receptors. *J Biol Chem* **278**, 14936-14939.
- Yamamoto M, Marui N, Sakai T, Morii N, Kozaki S, Ikai K, Imamura S & Narumiya S. (1993). ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* **8**, 1449-1455.
- Yamazaki Y, Umeda K, Wada M, Nada S, Okada M & Tsukita S. (2008). ZO-1- and ZO-2-dependent integration of myosin-2 to epithelial zonula adherens. *Mol Biol Cell* **19**, 3801-3811.
- Yang Y, Janich S, Cohn JA & Wilson JM. (1993). The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9480-9484.
- Yoo D, Flagg TP, Olsen O, Raghuram V, Foskett JK & Welling PA. (2004). Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* **279**, 6863-6873.
- Yoo JS, Moyer BD, Bannykh S, Yoo HM, Riordan JR & Balch WE. (2002). Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem* **277**, 11401-11409.
- Youker RT, Walsh P, Beilharz T, Lithgow T & Brodsky JL. (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.
- Younger JM, Chen L, Ren HY, Rosser MF, Turnbull EL, Fan CY, Patterson C & Cyr DM. (2006). Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* **126**, 571-582.
- Younger JM, Ren HY, Chen L, Fan CY, Fields A, Patterson C & Cyr DM. (2004). A foldable CFTR{Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. *J Cell Biol* **167**, 1075-1085.
- Yurko-Mauro KA & Reenstra WW. (1998). Prostaglandin F2alpha stimulates CFTR activity by PKA- and PKC-dependent phosphorylation. *Am J Physiol* **275**, C653-660.



- Zahraoui A. (2004). [Tight junctions, a platform regulating cell proliferation and polarity]. *Med Sci (Paris)* **20**, 580-585.
- Zapun A, Darby NJ, Tessier DC, Michalak M, Bergeron JJ & Thomas DY. (1998). Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem* **273**, 6009-6012.
- Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, Cutting G, Stetten G, Kieffer KA, Craig R & Guggino WB. (1991). A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**, 313-319.
- Zhang F, Hamanaka RB, Bobrovnikova-Marjon E, Gordan JD, Dai MS, Lu H, Simon MC & Diehl JA. (2006a). Ribosomal stress couples the unfolded protein response to p53-dependent cell cycle arrest. *J Biol Chem* **281**, 30036-30045.

- Zhang F, Kartner N & Lukacs GL. (1998). Limited proteolysis as a probe for arrested conformational maturation of delta F508 CFTR. *Nat Struct Biol* **5**, 180-183.
- Zhang H, Peters KW, Sun F, Marino CR, Lang J, Burgoyne RD & Frizzell RA. (2002). Cysteine string protein interacts with and modulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **277**, 28948-28958.
- Zhang H, Schmidt BZ, Sun F, Condliffe SB, Butterworth MB, Youker RT, Brodsky JL, Aridor M & Frizzell RA. (2006b). Cysteine string protein monitors late steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *J Biol Chem* **281**, 11312-11321.
- Zhang L, DiLizio C, Kim D, Smyth EM & Manning DR. (2006c). The G12 family of G proteins as a reporter of thromboxane A2 receptor activity. *Mol Pharmacol* **69**, 1433-1440.
- Zhang XM, Wang XT, Yue H, Leung SW, Thibodeau PH, Thomas PJ & Guggino SE. (2003). Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **278**, 51232-51242.
- Zhang Y, Li X, Grassmé H, Döring G & Gulbins E. (2010). Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cfr-deficient macrophages on infection. *J Immunol* **184**, 5104-5111.
- Zhu L, Jang GF, Jastrzebska B, Filipek S, Pearce-Kelling SE, Aguirre GD, Stenkamp RE, Acland GM & Palczewski K. (2004). A naturally occurring mutation of the opsin gene (T4R) in dogs affects glycosylation and stability of the G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **279**, 53828-53839.

Annexes

Sylvain CHAUVET

Date of birth: December, 31, 1985
Marital status: Married
Nationality: French

Address: 8, allée des Peupliers, 38450 Vif, FRANCE
Cell phone: +33 6 18 22 59 10
Mail: sylvain.chauvet.phd@gmail.com

Educational

2009/2011

PhD in cell biology, study of the degradation of the CFTR protein, in the BioMet team of LCBM/CEA Grenoble, Joseph Fourier University (Grenoble, FRANCE)

2008

Master degree in Integrative Cell Biology, Joseph Fourier University (Grenoble, FRANCE)

2006

Licence degree in General Biology, Joseph Fourier University (Grenoble, FRANCE)

Research experience

2009/2011

PhD: Study of the role of G α 12 and G α 13 proteins in CFTR- Δ F508 degradation and the control of intercellular junctions.

Team BioMet (Biology of Metals)

LCBM (Laboratory of Chemistry and Biology of Metals)/CEA Grenoble

Supervisor: Dr Mohamed Benharouga

2008

6 month course: Search for interaction partners of AMPK by a new approach of yeast two hybrid.

LBFA (Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics)/ Joseph Fourier University (Grenoble, FRANCE)

Supervisor: Pr Uwe Schlattner

2007

1 month course: Study of the role of hormones in the root growth of *Arabidopsis thaliana*.

LPDC (Plastids and Cell Differentiation Laboratory)/ Joseph Fourier University (Grenoble, FRANCE)

Supervisor: Dr Gilles Vachon

Skills

Molecular biology

DNA and protein enzymatic digestion, DNA and RNA extraction, DNA and RNA purification, DNA and RNA quantification, DNA ligation, DNA analysis on agarose gel, PCR, reverse transcription PCR, semi-quantitative PCR, quantitative PCR

Microbiology

Bacterial transformation and culture

Biochemistry

Protein extraction, protein quantification, immunoblot on SDS-PAGE gel, immunoprecipitation, promoter activity assessment

Microscopy

Immunohistochemistry, immunocytochemistry, proximity ligation (Duolink[®]), epifluorescence microscopy, confocal microscopy, FRAP

Cell culture

Culture of adherent cells (fibroblasts, epithelial cells (16HBE14o-, CFBE41o-), hepatocellular cells, neuroblastoma cells), transitory transfection, stable transfection, trans-epithelial resistance measurement, subcellular fractionation (differential centrifugation and sucrose gradient)

Communication

Posters:

- 5th European Young Investigators Meeting; Lille; France; 23-26 August 2011: Heterotrimeric G proteins alpha 12 (G α 12) and 13 (G α 13) modulate the barrier function of bronchial epithelial cell monolayer: role in cystic fibrosis.
- 12th French seminar of young cystic fibrosis researchers; Paris; France; 3-4 March 2011: Role of the G α 12/G α 13 proteins on the expression of the wild type and F508del CFTR protein (II).

- 11th French seminar of young cystic fibrosis researchers; Paris; France; 8 March 2010: Role of the Gα12/Gα13 proteins on the expression of the wild type and F508del CFTR protein (I).
- 10th French seminar of young cystic fibrosis researchers; Paris; France; 16 March 2009: CFTR-F508del and the Gα12/Gα13 proteins.

Oral:

- 5th European Young Investigators Meeting; Lille; France; 23-26 August 2011: Heterotrimeric G proteins alpha 12 (Gα12) and 13 (Gα13) modulate the barrier function of bronchial epithelial cell monolayer: role in cystic fibrosis.

Publications

- Brouillet S., Hoffmann P., Chauvet S., Salomon A., Chamboredon S., Sergent F., Benharouga M., Feige JJ. and Alfaidy N. (2011) Revisiting the role of hCG: new regulation of the angiogenic factor EG-VEGF and of its receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, [Epub ahead of print].
- Alfaidy N., Brouillet S., Chauvet S., Richaud P., Dakoune M., Demanzancourt P., Dieudonné M.N., Vaiman D., Hoffmann P., Feige JJ. and Benharouga M. Deregulations of cellular Prion protein in placental pathologies: Case of preeclampsia and intrauterine growth retardation. (*Submitted*)
- Alfaidy N., Chauvet S., Andrei S., Salomon A., Saoudi Y., Richaud P., Garcia CA., Hoffmann P., Andrieux A., Moulis JM., Feige JJ. and Benharouga M. Shedding lights on the role of cellular prion protein (PrP^C) in pregnancy: physiological and pathological implications. (*Submitted*)

Miscellaneous

- Languages: French (maternal), English (good skills)
- Students' supervision: I have supervised 1 undergraduate student (3 months) and 2 master's students (4 months each) during my PhD.
- Personal interests: nature, music, cinema, hiking ...

Referee

- PhD Mohamed BENHAROUGA
UMR 5249 CEA-CNRS-UJF
iRTSV/LCBM
CEA/Grenoble
17 rue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 09
France
Tel : +334 38 78 44 51
Fax : +334 38 78 54 87
e-mail : mohamed.benharouga@cea.fr
- PhD Nadia ALFAIDY
UMR_S 1036 CEA-INSERM-UJF
iRTSV/BCI
CEA/Grenoble
17 rue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 09
France
Tel : +334 38 78 35 01
Fax : +334 38 78 50 58
e-mail : nadia.alfaidy-benharouga@cea.fr
- PhD Patrice CATTY
Assistant Director of LCBM
UMR 5249 CEA-CNRS-UJF
iRTSV/LCBM
CEA/Grenoble
17 rue des Martyrs
38054 Grenoble cedex 09
France
Tel : +334 38 78 93 05
Fax : +334 38 78 54 87
e-mail : patrice.catty@cea.fr

Les protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ dans la mucoviscidose : Rôle dans la dégradation de la protéine CFTR mutée F508del et dans le contrôle des jonctions intercellulaires

70% des mutations identifiées sur le gène responsable de la mucoviscidose correspondent à la délétion de la phénylalanine en position 508 (F508del) de la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). 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), et par conséquent de l'absence de sécrétion des ions Cl^- au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. Deux conséquences principales de cette mutation sont l'épaississement important du mucus bronchique et la diminution de l'intégrité de la barrière luminale de l'épithélium bronchique. Ces deux phénomènes participent à l'invasion et à l'infection du tissu pulmonaire par des bactéries pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa*, exacerbant l'inflammation et la destruction tissulaire au niveau des poumons.

L'objectif de cette étude a été de déterminer le rôle de deux protéines appartenant à la famille des protéines G hétérotrimériques, $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$, dans la dégradation de la protéine CFTR-F508del ainsi que dans le contrôle des complexes jonctionnels au niveau de l'épithélium bronchique sain et mucoviscidique.

Nos travaux démontrent pour la première fois que dans la mucoviscidose, l'expression des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ est faible. Nous avons aussi montré que $G\alpha_{12}$, et non $G\alpha_{13}$, est impliquée dans le contrôle de la dégradation de la protéine CFTR-F508del *via* les protéines chaperonnes Calnexine et HSP90, et dans la formation et le maintien des jonctions cellulaires bronchiques *via* E-cadhérine et ZO-1 de manière inverse par rapport à l'épithélium rénale. Ces travaux montrent pour la première fois l'implication de la protéine $G\alpha_{12}$ dans la maladie de la mucoviscidose.

Mots clé : CFTR-F508del, mucoviscidose, réticulum endoplasmique, protéines G hétérotrimériques, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, chaperonnes, HSP90, Calnexine, jonctions cellulaires, E-cadhérine, ZO-1.

$G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ in cystic fibrosis: Role in F508del-CFTR degradation and in the control of intercellular junctions

F508del, the most frequent mutation found in cystic fibrosis (CF) population, impacts CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) trafficking and causes its rapid degradation at the endoplasmic compartment, resulting in a significant decrease in Cl^- secretion at the apical membrane of epithelial cells. F508del has two main features, significant thickening of the bronchial mucus and a reduction in the integrity of the luminal barrier of the bronchial epithelium. These two phenomena are involved in the invasion and infection of lung tissue by pathogenic bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, exacerbating the inflammation and lung destruction.

The objective of this study was to determine the role of two proteins member of the heterotrimeric G proteins family, $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$, in the degradation of the F508del-CFTR, and in the control of junctional complexes in the normal and CF bronchial epithelium.

Our results show for the first time that $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{13}$ are down expressed in CF. $G\alpha_{12}$, but not $G\alpha_{13}$, is involved in the control of F508del-CFTR degradation through its interaction with Calnexin and HSP90 chaperones. Unlike kidney epithelia cells, $G\alpha_{12}$ promotes the formation and maintenance of cell junctions in the bronchial epithelium by affecting E-cadherine and ZO-1 stability. Altogether, our results set therefore $G\alpha_{12}$ as a significant actor of the CF disease.

Key words: F508del-CFTR, cystic fibrosis, endoplasmic reticulum, heterotrimeric G proteins, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, chaperones, HSP90, Calnexine, cell junctions, E-cadherine, ZO-1.