

CFTR (CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR) : UNE PROTÉINE A MULTIPLES FONCTIONS

Edith Puchelle

RÉFÉRENCES

1. Riordan R, Rommens JM, Kerem R, Alon R, Rozmahel Z, Grzelczak Z, Zieliński J, Lok S, Plasvic N, Chou JL, Drumm MC, Januzzi C, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
2. Goossens M. Biologie de la mucoviscidose: progrès récents et perspectives. *médecine/sciences* 1991; 7: 1048-51.
3. Puchelle E, Gaillard D, Ploton D, Hinnrasky J, Fuchey C, Bouterin MC, Jacquot J, Dreyer D, Pavirani A, Dalemans W. Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 485-91.
4. Engelhardt J, Zepeda M, Cohn J, Yankaskas JR, Wilson JM. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest* 1993; 93: 737-49.
5. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its selectivity. *Science* 1991; 253: 202-5.
6. Cheng S, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990; 63: 827-34.

ADRESSE ET TIRÉS A PART

E. Puchelle: directeur de recherche à l'Inserm. Directeur de l'unité Inserm 314, hôpital Maison Blanche, 45, rue Cognacq-Jay, 51092 Reims Cedex, France.

L'identification et le clonage du gène codant pour la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), réalisés en 1989 par le groupe de Riordan, Tsui et Collins [1], ont représenté une étape déterminante dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des anomalies fonctionnelles cellulaires dans la mucoviscidose. Ce gène code pour une protéine transmembranaire d'un poids moléculaire de 170 kDa sous sa forme mûre, glycosylée. La protéine CFTR, qui comporte deux domaines transmembranaires à six hélices hydrophobes, est, avant tout, une protéine cytosolique formée de deux domaines hydrophiles NBF1 et NBF2 (*nucleotide binding fold*), sites de fixation de l'ATP, et d'un domaine régulateur R, phosphorylé par des protéine kinases [2]. Dès que la séquence en acides aminés de CFTR a été connue, de nombreuses questions se sont posées. Quelle est la fonction physiologique de la protéine CFTR? Où est-elle localisée, et, notamment, quelle est sa localisation cellulaire et subcellulaire à l'état physiologique et dans la mucoviscidose? Quel est son rôle par rapport aux autres canaux Cl⁻? Quelle est la relation entre, d'une part, l'expression de CFTR et sa localisation et, d'autre part, la sévérité de la maladie?

La disponibilité d'anticorps, développés contre des peptides de synthèse et reconnaissant certains épitopes des différents domaines de CFTR, a permis de localiser la protéine CFTR dans la région apicale de nombreux épithéliums, incluant l'épithélium respiratoire de surface, l'épithélium intestinal, les canaux pancréatiques et l'épithélium des glandes salivaires et bronchiques. Au niveau pulmonaire, principal organe cible de la mucoviscidose, la protéine CFTR a été identifiée au sein des cellules ciliées des voies aériennes proximales et, également, des cellules distales, bronchiolaires (cellules de Clara) et alvéolaires [3, 4]. Ces cellules épithéliales pulmonaires distales, de même que les cellules glandulaires de la sous-muqueuse, difficiles à atteindre par les aérosols, posent le problème de l'accessibilité du gène CFTR dans la thérapie génique.

L'article de C. Férec, B. Mercier et M. Audrezet (*p. 631 de ce numéro*), rappelle que, grâce aux 400 mutations de CFTR actuellement recensées, un certain nombre de relations structure-activité de la protéine ont pu être définies, laissant entrevoir des stratégies thérapeutiques différentes selon le type de mutation. Néanmoins, les relations génotype-phénotype dans la mucoviscidose sont encore loin d'être clairement définies et il faut bien reconnaître

qu'à l'heure actuelle les fonctions physiologiques de CFTR sont, elles aussi, encore incomplètement connues.

Il est maintenant admis que CFTR est un canal ionique de faible conductance (7 pS) sélectif pour les anions ($\text{Br} > \text{Cl} > \text{I}^-$), contrôlé par l'AMPc par l'intermédiaire de la phosphorylation de CFTR par la protéine kinase A au niveau du domaine R. L'activité de canal Cl^- de CFTR peut être induite dans des cellules qui n'expriment pas CFTR à l'état natif [5].

Dans 70 % des cas de mucoviscidose en Europe du Nord, la délétion de la phénylalanine en position 508 ($\Delta\text{F} 508$), située dans le domaine NBF1, altère la maturation de la protéine, empêche sa glycosylation et son ciblage à la membrane plasmique des cellules épithéliales qui, normalement, expriment CFTR [6]. Les anomalies du transit intracellulaire de CFTR semblent être liées à des molécules chaperons, telles que la molécule Hsp 70, dont le rôle normal est de faciliter le repliement et l'assemblage des protéines jusqu'à l'adoption de leur structure définitive. Il a été clairement montré que le complexe protéine chaperon Hsp 70-CFTR $\Delta\text{F} 508$ ne peut être dissocié, comme c'est le cas pour la protéine CFTR normale, avant son transport vers le Golgi [7]. Ce complexe reste retenu dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) pour être, ensuite, rapidement dégradé dans un compartiment lysosomal pré-golgien. D'autres protéines chaperons, comme la calnexine, pourraient également intervenir dans la rétention du CFTR au niveau du RER.

Il n'est pas exclu qu'une partie des molécules CFTR mutées puissent en partie « échapper » au contrôle des chaperons et s'intégrer au niveau de la membrane plasmique. Cela pourrait expliquer le maintien d'une expression résiduelle fonctionnelle de la forme $\Delta\text{F} 508$ CFTR qui se traduirait par une ouverture de canal moins fréquente que celle de CFTR normal, gardant cependant la possibilité de maintenir une certaine activation potentielle de la fonction canal Cl^- de CFTR [8].

La diminution de la stabilité de CFTR $\Delta\text{F} 508$ et de son temps de résidence dans la membrane plasmique (4 h pour le mutant $\Delta\text{F} 508$ et plus de 24 h pour la forme CFTR normale) suggère que les développements pharmacologiques futurs, visant à restaurer la fonction de CFTR, devraient avoir pour buts, non seulement d'activer d'éventuels canaux Cl^- CFTR résiduels, de limiter l'effet « gendarme » des molécules chaperons dans le contrôle du transit intracellulaire, mais aussi de prolonger le temps de résidence de la protéine CFTR [9].

La protéine canal Cl^- CFTR participe au flux ionique transépithélial qui s'accompagne d'un flux d'eau modulant l'hydratation du mucus et de la muqueuse respiratoire et contrôlant l'osmolarité du liquide qui baigne les cellules épithéliales, notamment au niveau de la phase périciliaire. Les modifications de l'osmolarité de la phase périciliaire peuvent empêcher l'hydratation du mucus, augmenter sa viscosité et inhiber son exocytose, diminuant ainsi le transport muco-ciliaire [10]. Ces modifications d'osmolarité peuvent également favoriser l'émergence de récepteurs membranaires (glycolipides, glycoprotéines ou protéoglycanes) qui seraient spécifiquement reconnus par *Pseudomonas* [11]. On ne sait cependant pas, à l'heure actuelle, si les infections à *Pseudomonas* sont, avant tout, secondaires à une diminution primitive de la clairance muco-ciliaire par réaction de la cellule épithéliale à un environnement particulier, ou si la diminution de la clairance muco-ciliaire est, à l'inverse, inductrice de néo-récepteurs membranaires de l'épithélium par libération d'exotoxines bactériennes dans la lumière bronchique. Il a été démontré qu'en phase de réparation, les cellules épithéliales CF $\Delta\text{F} 508$ présentent une plus grande affinité pour les *Pseudomonas* que les cellules normales [12]. L'hypothèse d'une anomalie post-traductionnelle de la biosynthèse des mucines sécrétées par les malades atteints de mucoviscidose, évoquée par Lamblin *et al.* [13], est en accord avec les travaux du groupe

d'Al-Awqati [14] qui démontrent que le défaut d'acidification des différents compartiments cellulaires (golgiens ou trans-golgiens au niveau des prélysosomes ou endosomes) peut induire, par suite d'une mutation de CFTR, un dysfonctionnement de la synthèse des sialyl et sulfoltransférases. CFTR aurait donc une activité de canal Cl^- , non seulement au niveau de la membrane plasmique, mais aussi de celle des organites intracellulaires.

Le fait que la protéine CFTR soit un canal Cl^- n'exclut pas la possibilité que CFTR possède aussi d'autres fonctions, notamment celle de former des pores multi-ioniques, physiologiquement perméables à plusieurs anions. Certaines mutations des hélices transmembranaires, portant, notamment, sur Arg 347 ou Lys 335, réduisent la conductance par conversion du pore multi-ionique CFTR en un pore mono-ionique [15]. Il n'est pas exclu que CFTR puisse, également, agir comme un transporteur actif de molécules. Cette hypothèse repose sur les similitudes de séquence de CFTR avec les membres de la superfamille des ATPases/ABC, transporteurs dont le représentant le plus connu est la protéine MDR (*multi-drug resistance P-glycoprotein*); sa surexpression dans certaines cellules cancéreuses est responsable du phénomène de résistance aux drogues anticancéreuses. De même que la glycoprotéine P peut être un canal Cl^- (*m/s n° 5, vol. 8, p. 504*), on peut imaginer, par analogie, que CFTR pourrait jouer un double rôle, associant à la fonction de canal Cl^- celle de transporteur de molécules. La fonction multicanal et pore à eau du CFTR (transport d'anions, d'eau et de petites molécules solubles comme l'urée) a également été décrite [16]. S'il est classiquement admis que l'hydrolyse de l'ATP est essentielle à l'activation du canal CFTR, il a été suggéré par Quinton et Reddy [17] que l'ouverture du canal CFTR pourrait aussi être modulée par la concentration intracellulaire en ATP. En dessous du seuil de 5 mM, indispensable aux fonctions énergétiques essentielles

de la cellule (maintien du volume, du pH, de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} ...), la conductance du Cl^- ne pourrait être activée. La mutation ΔF 508 de CFTR affecterait la « sensibilité » de la cellule à détecter une concentration seuil d'ATP intracellulaire, ce qui entraînerait une absence de signal d'ouverture du canal Cl^- .

Une autre fonction primordiale de CFTR semble être de réguler la sécrétion des protéines et glycoprotéines. Les travaux du groupe de McPherson [18] ont montré que l'incorporation d'anticorps anti-CFTR dans des cellules sécrétoires sous-maxillaires inhibait la sécrétion de mucines sous l'effet des agonistes β_2 adrénergiques. Les travaux de Merten et Figarella [19], sur des cultures de cellules épithéliales glandulaires bronchiques recueillies chez des malades atteints de mucoviscidose, confirment qu'il existe, en effet, une hypersécrétion constitutive de ces différentes protéines et une absence de régulation par les agonistes cholinergiques et adrénergiques. De telles anomalies sont probablement liées, en partie, à une mauvaise régulation des mécanismes d'endocytose et d'exocytose. Bradbury *et al.* [20] ont montré, en effet, sur une lignée de cellules épithéliales coliques et sur des cellules pancréatiques homozygotes pour la mutation ΔF 508 (CF-PAC), que CFTR joue un rôle important dans la régulation du recyclage membranaire. Alors que les cellules pancréatiques CF n'avaient pas de régulation de l'endocytose ni de l'exocytose par l'AMPc, les cellules transfectées exprimant CFTR étaient normalement sensibles à cet agent qui inhibe l'endocytose et stimule l'exocytose. CFTR n'intervient donc probablement pas simplement comme une protéine membranaire plasmique, mais semble également impliqué dans le contrôle des processus de transit intracellulaire. Ainsi, CFTR pourrait influencer la sécrétion de mucines et d'autres protéines en agissant sur le « trafic » endomembranaire et augmenter le nombre de transporteurs ioniques.

La régulation du gène CFTR à l'état physiologique et dans la mucoviscidose reste encore aujourd'hui un problème posant plus de questions qu'il n'en résout [21]. Une relation inverse entre le taux d'ARNm du CFTR et l'expression et la fonction de canal Cl^- de la protéine CFTR a été mise en évidence au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales [22], ce qui suggère l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de CFTR, variable en fonction de la différenciation tissulaire, et, peut-être, des phénomènes de remaniement de l'épithélium respiratoire [23]. Une anomalie de la distribution de CFTR, voire même une absence de protéine CFTR, a en effet été démontrée lorsque l'épithélium respiratoire, normalement pseudostratifié, se transforme en épithélium de type hyperplasique (hyperplasie basale ou muqueuse) ou métaplasique (métaplasie malpighienne).

Si la « longue marche » des généticiens a permis de découvrir la séquence du gène CFTR, une marche probablement aussi longue reste à accomplir pour connaître de façon précise les relations entre structure et activité fonctionnelle de la protéine CFTR. Les fonctions cellulaires et moléculaires, physiologiques, de CFTR ne sont certainement pas toutes connues. CFTR est une protéine qui nous réserve encore bien des surprises! ■

RÉFÉRENCES

- Yang Y, Janich S, Cohn JA, Wilson JM. The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognised by Hsp70 and degraded in a pre-golgi, non-lysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9480-4.
- Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavlani A, Lecocq J, Lazdunski M. Altered chloride ion channel kinetics associated with ΔF 508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 1991; 354: 524-8.
- Lukacs GL, Chang XB, Bear C, Kartner N, Mohamed A, Riordan JR, Grinstein S. The ΔF 508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. *J Biol Chem* 1993; 268: 592-7.
- Quinton P. Viscosity versus composition in airway pathology. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 6-7.
- Pennacino-Sauvage M, Hulen C. Implantation et persistance des souches mucoides de *Pseudomonas aeruginosa* dans les poumons de malades atteints de mucoviscidose. *médecine/sciences* 1990; 6: 886-94.
- Girod de Benlzmann S, Bajolet-Laudinat O, Dupuit F, Pierrot D, Fuchey C, Plotkowski MC, Puchelle E. Protection of the respiratory epithelium from *Pseudomonas aeruginosa* adherence by phosphatidylglycerol liposomes. *Infect Immun* 1994; 62: 704-8.
- Lamblin G, Lhermitte M, Périni JM, Roussel P. Diversité des chaînes glycaniques des mucines bronchiques humaines et défense antimicrobienne de la muqueuse bronchique. *médecine/sciences* 1991; 7: 1031-40.
- Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruener D, Al-Awqati Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 1991; 352: 70-3.
- Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW. Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature* 1993; 366: 79-82.
- Hasegawa H, Skach W, Baker O, Calayag MC, Lingappa V, Verkman AS. A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. *Science* 1992; 258: 1477-9.
- Quinton PM, Reddy MM. Control of CFTR chloride conductance by ATP level through non hydrolytic binding. *Nature* 1992; 360: 79-81.
- Lloyd-Mills CL, Pereira MC, Dormer RL, McPherson MA. An antibody against a CFTR-derived synthetic peptide, incorporated into living submandibular cells, inhibits beta-adrenergic stimulation of mucin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 1146-52.
- Merten M, Figarella C. Constitutive hypersecretion and insensitivity to neurotransmitters by cystic fibrosis tracheal gland cells. *Am J Physiol* 1993; 264: 93-9.
- Bradbury NA, Jilling T, Kirk KL, Bridges RJ. Regulated endocytosis in chloride secretory epithelial cell line. *Am J Physiol* 1992; 262: 752-9.
- Denamur E. Régulation du gène CFTR: beaucoup de questions, peu de réponses. *médecine/sciences* 1994; 10: 74-7.
- Sood R, Bear C, Auerbach W, Reyes E, Jensen T, Kartner N, Riordan JR, Buchwald M. Regulation of CFTR expression and function during differentiation of intestinal epithelial cells. *EMBO J* 1992; 11: 2487-94.
- Dupuit F, Brezillon S, Hinnrasky J, Gaillard D, Tümmler B, Klossek JM, Puchelle E. Localization of CFTR in remodeled human surface airway epithelium. *Ped Pulmonol* 1993; 9 (suppl): 205 (abstr).