

Mucoviscidose : le mutant $\Delta F508$ est fonctionnel

RÉFÉRENCES

- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene : chromosome walking and jumping. *Science* 1989 ; 245 : 1059-65.
 - Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989 ; 245 : 1066-73.
 - Goossens M. Biologie de la mucoviscidose. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 1048-51.
 - Marie JP. Le phénomène de résistance multiple aux anticancéreux : les gènes *MDR* et la P-gp. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 443-8.
 - Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, *et al.* Expression of CFTR corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990 ; 347 : 358-63.
 - Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, *et al.* Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 1990 ; 62 : 1227-33.
 - Kartner N, Hanrahan JW, Jensen TJ, *et al.* Expression of CF gene in non epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell* 1991 ; 64 : 681-91.
 - Champigny G, Verrier B, Gérard C, Mauchamp J, Lazdunski M. Small conductance chloride channels in the apical membrane of thyroid cells. *FEBS Lett* 1990 ; 259 : 263-8.
 - Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its selectivity. *Science* 1991 ; 253 : 202-5.
- En Europe, une personne sur 20 porte, à l'état hétérozygote, la forme mutée du gène responsable de la mucoviscidose (*cystic fibrosis* dans la terminologie anglo-saxonne). Cette maladie est donc, par le nombre de cas annuels, la maladie héréditaire la plus répandue. Elle se traduit par la formation d'un mucus extrêmement épais au niveau de différents épithéliums (poumon, intestin, pancréas exocrine), liée à l'altération du transport d'électrolytes (essentiellement la sécrétion d'ions chlorures). En 1989, le gène a été identifié et cloné par l'équipe du Pr. L.C. Tsui [1]. La protéine correspondante fut baptisée CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) en raison de son implication physiologique dans la régulation des transports ioniques épithéliaux [2].
- Structurellement, CFTR est une protéine membranaire longue de 1 480 acides aminés [3] insérée dans la membrane par deux domaines (dénommés TM1 et TM2) contenant chacun six hélices α -hydrophobes. A la suite de chacun de ces deux domaines est situé un domaine de fixation des nucléotides (dénommés NBD1 et NBD2), orientés du côté cytoplasmique. Entre NBD1 et TM2 se trouve une zone cytoplasmique hydrophile, baptisée domaine R, qui contient l'essentiel des sites de phosphorylation par les protéines kinases A et C, et qui pourrait donc correspondre à une zone régulatrice de l'activité de la protéine. Une homologie de structure et de séquences primaires existe entre CFTR et une famille de transporteurs qui possèdent la même alternance de domaines transmembranaires et de sites de fixation des nucléotides. Le représentant le plus connu de cette famille est sans doute la protéine MDR (*multi drug resistance*), dont l'hyper-expression dans certaines cellules cancéreuses est responsable de leur résistance aux drogues anti-cancéreuses [4]. Les analogies de structure avec cette famille suggèrent que CFTR pourrait servir à transporter une molécule régulatrice des activités de flux ioniques dans les cellules épithéliales, ou, plus simplement encore, être elle-même un canal ionique permettant le passage des ions chlorures.
- Les résultats les plus récents, obtenus sur des cellules exprimant de façon hétérologue la protéine CFTR [5-7] montrent qu'elle fonctionne comme un canal ionique de petite conductance, sélectif pour les anions (bromure > chlorure > iodure), identifié pour la première fois sur des cellules thyroïdiennes [8]. Ce canal est contrôlé positivement par l'AMP cyclique, *via* la phosphorylation de CFTR par la protéine kinase A. La construction par mutagenèse dirigée d'un certain nombre de mutants et leur analyse ont permis de démontrer plusieurs points.
- CFTR constitue bien le canal ionique observé sur les cellules transfectées [9], et n'est pas seulement le régulateur de quelque canal ionique endogène, puisque des mutations ponctuelles dans sa séquence permettent de modifier le filtre de sélectivité du canal (c'est-à-dire de le rendre plus perméable pour le chlorure que pour le bromure, alors que c'est l'inverse dans la protéine native). De plus, l'expression fonctionnelle de CFTR a maintenant été obtenue dans un grand nombre de systèmes différents, avec toujours le même type de réponses (*m/s* n° 8, vol. 7, p. 871 et 874).
 - Plusieurs résidus sérine (tous situés dans le domaine R) sont phosphorylés lors de l'activation du canal par la pro-

téine kinase A, et leur remplacement par des résidus alanine fait disparaître l'activation du canal par l'AMP cyclique [10].

3. Outre la phosphorylation de la protéine par la protéine kinase A, son activation nécessite la fixation de nucléotides triphosphates hydrolysables (ATP > GTP > ITP = UTP > CTP) sur l'un (ou les deux) NBD. Ce résultat suggère que l'hydrolyse des nucléotides triphosphates joue un rôle dans les mécanismes d'ouverture de CFTR [11].

Un grand nombre des mutations répertoriées chez les individus touchés par la mucoviscidose (il y en a plus de 100 à ce jour) correspond à des mutations ponctuelles qui vont modifier un et un seul des 1 480 acides aminés. La fixation des nucléotides semble primordiale dans le mécanisme de fonctionnement de CFTR puisque la plupart de ces mutations sont justement situées au niveau des sites de fixation des nucléotides. Par exemple, 70 % des cas de mucoviscidose en Europe du Nord sont dus à la délétion de la phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$), située au milieu du premier NBD [2]. Il existerait donc entre le déclenchement de la maladie et la structure moléculaire de CFTR un lien qui se situerait au niveau de ces sites de fixation des nucléotides. Une première étude [12] a permis de mettre en évidence certaines différences structurales entre le CFTR normal et certains CFTR mutés. Par exemple, les mutations $\Delta I507$, $\Delta F508$, $S549I^*$ empêchent certaines modifications post-traductionnelles de la protéine ; alors que le poids moléculaire apparent du CFTR normal est de 170K sur gel de polyacrylamide-SDS, il n'est plus que de 140K pour ces mutants. D'après cette étude, ces protéines mutantes ne pourraient pas être insérées dans la membrane plasmique. La même équipe a toutefois observé que d'autres mutations responsables de la maladie (par exemple $G551D^{**}$) ne modifient

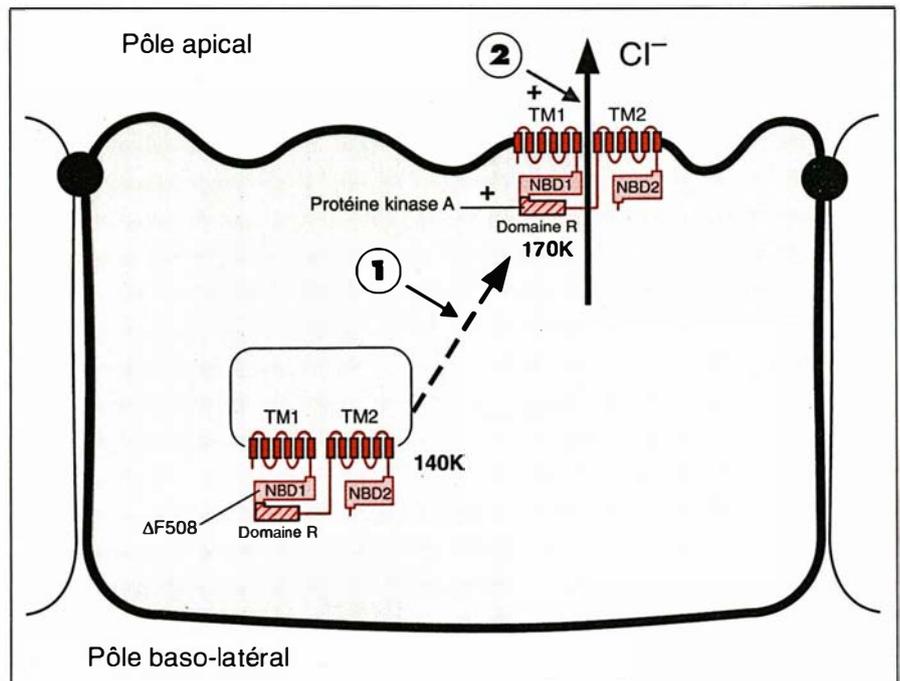


Figure 1. **Les approches pharmacologiques pour la mucoviscidose.** ① restaurerait la conversion des formes mutées non matures (140K) en forme mature (170K) (trait pointillé). ② rétablirait sur les protéines matures la sécrétion de chlore à son niveau normal.

pas la migration de la protéine (PM = 170K). Il existe donc d'autres mécanismes par lesquels ces mutations aboutissent au non fonctionnement du canal.

Nous avons mis en évidence un tel mécanisme grâce à l'expression fonctionnelle de CFTR et du mutant $\Delta F508$ -CFTR, après infection de fibroblastes (lignée *Vero*) avec des virus recombinants de la vaccine portant les séquences normale ou mutée de CFTR [13]. En utilisant des anticorps capables d'immunoprécipiter la protéine, nous avons tout d'abord confirmé la différence de maturation de CFTR et de $\Delta F508$ -CFTR : après un marquage métabolique des cellules infectées, des formes de 140K et de 170K sont identifiées sur les cellules exprimant CFTR. La cinétique d'apparition des deux formes montre que la forme de 170K est obtenue à partir de la forme de 140K. L'immunoprécipitation des protéines marquées, à la suite d'une iodation de surface de ces cellules, ne révèle que la forme de 170K. Cette forme est donc bien a

priori la seule forme insérée dans la membrane plasmique. Des expériences menées en parallèle sur les cellules exprimant $\Delta F508$ -CFTR montrent que la forme de 170K y est présente en quantité beaucoup plus faible. Il y a donc bien une moindre efficacité de maturation de la protéine mutante jusqu'à la membrane plasmique.

Nous avons alors constaté une activité résiduelle de la forme $\Delta F508$ -CFTR. L'activité du canal est révélée, de façon classique, par l'ajout d'analogues de l'AMP cyclique ou d'activateurs de l'adénylate cyclase, qui augmentent alors notamment le flux sortant d' ^{125}I , sur des cellules préalablement chargées. Après expression du CFTR, une accélération moyenne (de six fois) de la sortie d'iodure est observée ; cette accélération est de 2,5 fois sur les cellules exprimant $\Delta F508$ -CFTR ; aucune accélération n'est notée sur les cellules témoins. Des résultats analogues sont obtenus par des mesures du courant total à travers la membrane cellulaire (technique d'enregistrement sur cellule entière) : il y a augmentation du cou-

* C'est-à-dire, délétion de l'isoleucine 507, de la phénylalanine 508 et mutation $Se^{549} \rightarrow Il$.

** $Gly^{551} \rightarrow Asp$.

rant total sur les cellules exprimant CFTR et $\Delta F508$ -CFTR, l'augmentation étant plus forte sur les premières. Le courant comme l'activité de transport d'iodure est portée par un canal anionique de petite conductance en tout point identique au canal précédemment décrit [7]. Les caractéristiques biophysiques du canal CFTR normal et du canal $\Delta F508$ -CFTR sont rigoureusement identiques : même conductance unitaire, même sélectivité ionique, même cinétique d'ouverture, même indépendance vis-à-vis du potentiel. Cependant, la probabilité d'ouverture du canal $\Delta F508$ -CFTR est trois fois plus faible que celle du canal CFTR, cette différence étant expliquée par des temps de fermeture du canal $\Delta F508$ -CFTR beaucoup plus longs que ceux du canal CFTR. Globalement, le canal restant fermé trois fois plus longtemps, la cellule va effectivement transporter moins d'ions chlorures.

D'après ces résultats, l'activité du canal ionique dans les cellules exprimant la forme mutée $\Delta F508$ -CFTR est sévèrement restreinte par le cumul des deux effets : (1) défaut de maturation de la protéine qui limite la quantité de CFTR présent dans la membrane plasmique ; (2) ouverture du canal moins fréquente qui diminue l'activité des protéines matures. Notre travail montre qu'une forme pathologique de CFTR est malgré tout capable de fonctionner, même plus faiblement. Il suggère ainsi deux approches pharmacologiques complémentaires. La première aurait pour but de corriger le défaut de maturation. La seconde viserait à découvrir une nouvelle classe d'activateurs de canaux chlorures, qui agiraient directement au niveau de la protéine CFTR, en rétablissant l'activité normale du canal, sans passer par une phosphorylation *via* la protéine kinase A. Si pour CFTR de telles molécules restent à découvrir, il existe, en revanche, pour plusieurs autres types de canaux ioniques, des exemples connus : la vétratridine et certaines toxines d'anémones de mer ou de scorpion activent le canal sodium dépendant du potentiel ; le Bay-K8644 active le canal calcium dépendant du potentiel, le pinacidil

active les canaux potassium contrôlés par l'ATP. Ces deux voies, qui n'impliquent pas le passage par la thérapie génique, restent désormais à explorer ■

Pascal Barbry

Cnrs, institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, université de Nice, Sophia Antipolis, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.

RÉFÉRENCES

10. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 1991 ; 66 : 1027-36.
11. Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 1991 ; 67 : 775-84.
12. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990 ; 63 : 827-34.
13. Dalemans W, Barbry P, Champigny G, *et al.* Altered chloride channel kinetics associated with the major cystic fibrosis mutation. *Nature* 1991 ; 354 : 526-8.

TIRÉS A PART

P. Barbry.

Pascal Barbry dédicace cet article à la mémoire de Jean-Pierre Lecocq, directeur scientifique de la société *Transgène*, qui fut l'un des initiateurs de ce projet, disparu accidentellement le 20 janvier 1992.