

# L'analyse phylogénétique du gène CFTR plaide pour l'utilisation du lapin comme modèle animal dans la mucoviscidose

Sandrine Vuillaumier, Jocelyne Hinrasky, Guillaume Lecointre, Claudine Lapoumériou, Bernhard Koltenboeck, Pierre Lehn, Édith Puchelle, Erick Denamur

*A l'heure des premiers essais de thérapie génique chez l'homme dans la mucoviscidose, il n'existe pas de modèle animal totalement satisfaisant. Bien que les modèles murins présentent partiellement des signes phénotypiques de mucoviscidose, les atteintes pulmonaires et pancréatiques retrouvées chez l'homme ne sont pas totalement reproduites, du fait des différences de profil d'expression du CFTR et des différences anatomiques et physiologiques entre l'homme et les rongeurs. Afin d'identifier une espèce animale qui pourrait représenter un meilleur modèle que les modèles*

*murins existants, nous avons réalisé une analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques de la région promotrice et de l'ADNc du CFTR chez différentes espèces de mammifères. Ces résultats ont été confrontés aux données histologiques et immunohistochimiques du CFTR au niveau de l'épithélium respiratoire. La comparaison des séquences de la région promotrice permet clairement de séparer deux groupes : les rongeurs (rat et souris) d'une part et les autres espèces (homme, gibbon, cynomolgus, ouistiti, vache et lapin). L'analyse phylogénétique de l'ADNc du CFTR confirme que la séquence*

*du lapin est plus proche de celle de l'homme que de celle des rongeurs. Cette divergence inattendue lapin-rongeur est corroborée par les analyses de l'épithélium respiratoire de surface. Ces résultats suggèrent que le lapin peut être un outil pour l'étude du transfert de gène au niveau pulmonaire et qu'il pourrait conduire à un meilleur modèle de mucoviscidose que les modèles murins actuels par inactivation sélective du CFTR quand des cellules embryonnaires souches de lapin seront disponibles.*

**D**ans la mucoviscidose, le gène en cause code pour la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) qui appartient à la famille des protéines ABC (*ATP binding cassette*) [1]. L'expression du gène *CFTR*, limitée à quelques groupes de cellules spécialisées d'origine épithéliale est contrôlée pendant le développement. Les principaux symptômes cliniques de la mucoviscidose (maladie chronique obstructive pulmonaire, insuffisance pancréatique et iléus méconial) sont en relation avec le lieu d'expression de la protéine CFTR. Les études des

profils d'expression du gène *CFTR* chez l'homme et les rongeurs, basées sur l'analyse de l'ARNm ou de la protéine, mettent en évidence des résultats globalement identiques mais des différences existent selon les espèces, notamment au niveau du pancréas et du poumon. Plusieurs groupes ont créé des modèles murins de mucoviscidose en interrompant le gène *CFTR* ou, plus récemment, en introduisant des mutations trouvées chez l'homme ( $\Delta F508$ ,  $G551D^-$ ). Bien que ces animaux présentent partiellement des signes phénotypiques de mucoviscidose, les atteintes pulmonaires et pancréatiques retrouvées

chez l'homme ne sont pas totalement reproduites (*m/s* n° 7, vol. 8, p. 653). Ces données sont corrélées aux profils d'expression du *CFTR* ainsi qu'aux différences anatomiques et physiologiques entre l'homme et les rongeurs. Le fait que le système respiratoire soit peu affecté dans le modèle murin de la mucoviscidose pose un problème majeur dans la mesure où l'atteinte pulmonaire est la cause principale de morbidité et de mortalité chez l'homme (*m/s* n° 6/7, vol. 12, p. 837) et que les vecteurs utilisés dans les essais de thérapie génique ciblent les cellules épithéliales respiratoires [2, 3]. Ainsi,

un modèle animal reproduisant la mucoviscidose de manière plus fiable que le modèle souris serait bénéfique à la compréhension de la physiopathologie de la maladie. Ce modèle permettrait aussi de tester différentes approches thérapeutiques, tout particulièrement les vecteurs de thérapie génique [4].

Un tel modèle pourrait idéalement être développé dans une espèce de mammifères qui est assez proche de l'homme sur le plan anatomique, physiologique et développemental. En outre, le profil d'expression ainsi que la séquence de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène *CFTR* devraient être similaires chez l'animal modèle choisi et chez l'homme. Enfin, la durée de vie de cette espèce devrait être assez longue pour permettre le développement du processus pathologique pulmonaire de la mucoviscidose et l'évaluation à long terme de différentes approches thérapeutiques.

Afin d'identifier une telle espèce, les séquences de la région promotrice et de l'ADNc du *CFTR* chez différentes

espèces de mammifères ont été comparées [5] et ces résultats ont été confrontés aux données histologiques et immunohistochimiques du *CFTR* au niveau de l'épithélium respiratoire.

### Les séquences de la région promotrice du *CFTR* des rongeurs divergent nettement de celles des autres mammifères étudiés

Une séquence comprenant 2,3 kb en amont du codon d'initiation ainsi que 350 pb du premier intron a été analysée chez 8 espèces de mammifères représentant 4 différents ordres [5]. Il s'agit des Primates (*Homo sapiens*: homme, *Hylobates lar*: gibbon, *Macaca fascicularis*: cynomolgus et *Saimiri sciureus*: ouistiti), des Artiodactyles (*Bos taurus*: vache), des Lagomorphes (*Oryctolagus cuniculus*: lapin) et des Rongeurs (*Rattus norvegicus*: rat et *Mus musculus*: souris).

La comparaison des séquences permet de séparer clairement deux

groupes: les rongeurs, d'une part, et les autres espèces (dont le lapin), d'autre part (figure 1). Des divergences entre ces deux groupes ont été observées dans de potentiels éléments régulateurs en *cis*, notamment une séquence purine pyrimidine de 350 pb spécifique des rongeurs située à 500 pb en amont du codon d'initiation [6] et un motif de 9 pb dans le premier intron [7]. Cela est un argument pour proposer que ces divergences aient un rôle dans les différences d'expression entre ces deux groupes. En d'autres termes, les rongeurs semblent avoir accumulé au niveau de ces séquences non codantes plus de transformations nucléotiques que n'en n'ont subi les autres espèces présentes, ce qui est conforme au constat de Li *et al.* concernant l'accélération des taux d'évolution des régions flanquantes et des introns de nombreux gènes chez les rongeurs par rapport aux primates [8].

### L'analyse phylogénétique de l'ADNc *CFTR* confirme que la séquence du lapin est plus proche de celle de l'homme que de celle des rongeurs

Les ADNc du *CFTR* de nombreuses espèces de vertébrés ont maintenant été séquencés (mammifère, amphibien et chondrichthyen). Bien que ces espèces présentent des temps de divergence allant jusqu'à 420 millions d'années, leurs ADNc du *CFTR* sont très conservés [5].

Afin de déterminer si le point de branchement des rongeurs concernait l'ensemble du locus *CFTR*, les séquences d'ADNc disponibles ont été analysées [5]. Cette analyse a de plus permis de raciner l'arbre avec un groupe extérieur non euthérien (*Xenopus laevis*: grenouille). L'étude d'une séquence de 516 pb (exon 13 du *CFTR*) correspondant au domaine de régulation (R) a permis d'établir un arbre phylogénétique robuste avec différentes techniques (figure 2). Nous avons vérifié que les séquences n'étaient pas saturées ni en transition, ni en transversion à chaque position de codon. Celles-ci ne présentent pas de bases de biais de com-

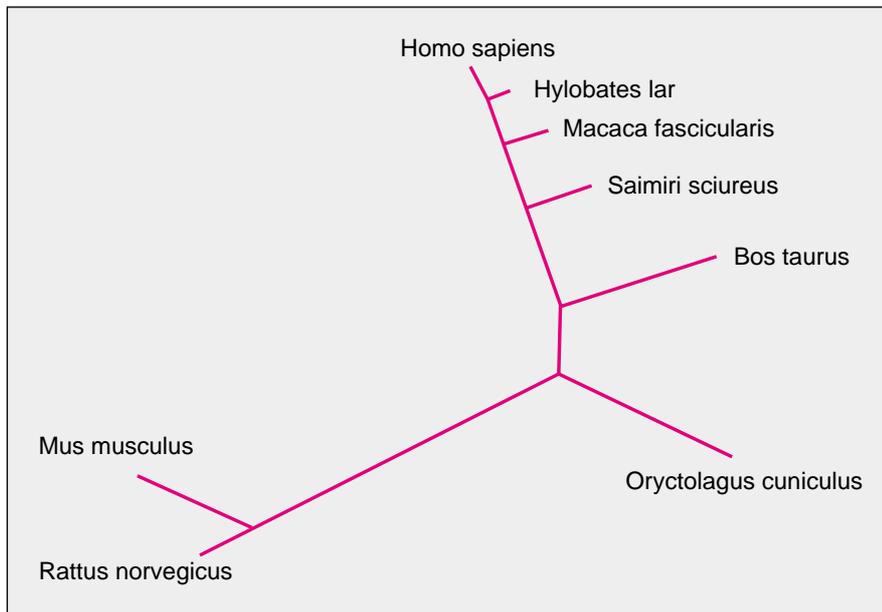


Figure 1. **Phénoграмme non raciné (méthode Neighbor-Joining) obtenu à partir des distances brutes des régions 5' non traduites du *CFTR* montrant la divergence importante des séquences de rongeurs [5]. Le même phénoграмme est obtenu à partir des régions de l'intron 1 du *CFTR* (résultat non montré). En terme de similarité globale, le lapin est moins éloigné de l'homme que ne le sont les rongeurs.**

position entre espèces. Ce point est important à souligner car pour beaucoup de gènes, les rongeurs ont des modalités d'évolution différentes de celles trouvées dans d'autres ordres de mammifères. Enfin, on ne détecte pas d'accélération d'évolution des séquences de l'ADNc du *CFTR* chez les rongeurs, contrairement à ce qui avait été détecté pour la région promotrice. L'arbre obtenu montre bien que le lapin est séparé des rongeurs. Ces résultats ainsi que les données concernant l'organisation génomique du complexe majeur d'histocompatibilité [9] et des gènes des chaînes  $\gamma$  des récepteurs des cellules T [10] renforcent l'hypothèse audacieuse (car limitée à une analyse à 4 espèces [11]) avancée par Graur *et al.* [12] selon laquelle le lapin est plus proche des primates que des rongeurs. D'autres séquences de marsupiaux ou d'ordres des mammifères primitifs pourraient utilement être ajoutés à ces données avant d'établir des conclusions définitives.

**Cette divergence inattendue lapin-rongeur est corroborée par les analyses de l'épithélium respiratoire de surface**

L'épithélium de surface de la trachée du lapin adulte est très similaire à ceux de l'homme, du singe et du bœuf (figure 3). Ces épithéliums sont de type pseudo-stratifié et composés de trois types principaux de cellules (les cellules basales, les cellules ciliées et les cellules muqueuses sécrétoires) avec une prédominance des cellules ciliées [13]. A l'inverse, l'épithélium respiratoire de surface des rongeurs est essentiellement composé de cellules de Clara\* et de cellules ciliées [14]. L'étude de la synthèse de la protéine CFTR par immunohistochimie (figure 3), met en évidence un immunomarquage limité à la membrane apicale des cellules ciliées de façon identique chez l'homme, le singe, le bœuf et le

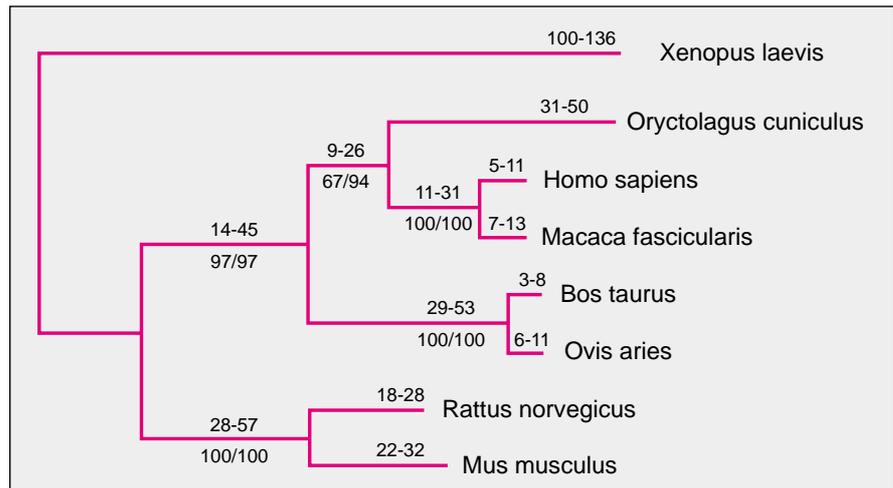


Figure 2. **Phylogénie obtenue à partir de 516 pb de l'ADNc CFTR correspondant au domaine R.** L'arbre le plus parcimonieux a été obtenu à partir d'une recherche exhaustive avec PAUP [23] à partir de la matrice recodée ( $l = 401$  pas, indice de cohérence = 0,87, indice de rétention = 0,745). Les chiffres au-dessus des branches indiquent la taille des branches minimum et maximum selon l'optimisation des homoplasies. Les chiffres en dessous des branches correspondent à la proportion de bootstrap [24] obtenue à partir d'analyse de parcimonie/distance (Neighbor-Joining), les deux avec 1 000 itérations [5].

lapin. En outre, chez le lapin, nous avons observé que le remodelage de l'épithélium de surface associé à une inflammation induit une augmentation du nombre des cellules basales avec une métaplasie squameuse, comme cela est trouvé au niveau de l'épithélium basal du nez chez

l'homme [15] et chez d'autres primates [16]. Ce remodelage de l'épithélium de surface a, chez le lapin, des conséquences similaires sur l'expression du CFTR à ce qui est observé chez l'homme [15, 17], avec une diminution importante voire une absence de l'immunoréactivité

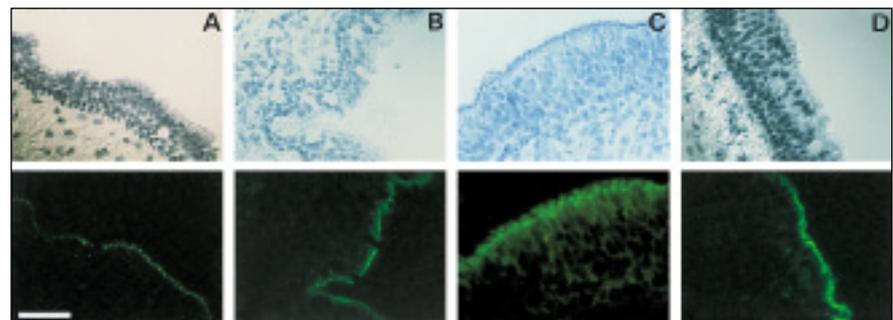


Figure 3. **Étude en optique Nomarski (photos supérieures) et immunodétection du CFTR correspondante (photos inférieures) de sections d'épithélium respiratoire de surface au niveau de tissu nasal chez l'homme (A), et de trachée chez le macaque (B), le bœuf (C) et le lapin (D).** La barre correspond à 50  $\mu$ m (un agrandissement de  $\times 220$ ) est utilisé pour toutes les photos). Deux anticorps monoclonaux de souris anti-CFTR (MATG 1104 et MATG 1061, Transgène, Strasbourg, France) dirigés contre deux peptides de synthèse (acides aminés 722 à 734 dans le domaine R et acides aminés 503 à 515, sans le résidu 508, dans le premier domaine fixant l'ATP du CFTR) ont été utilisés.

\* Les cellules de Clara sont des cellules appartenant à l'épithélium respiratoire des rongeurs qui ne sont pas ciliées mais qui sont sécrétoires. Elles ne sont pas muqueuses et ne se colorent pas au PAS.

apicale CFTR (résultats non montrés). Enfin, comme chez l'homme, l'expression des transcrits et de la protéine CFTR apparaît très précocement chez le lapin au cours du développement fœtal [18].

### **Implication de ces analyses phylogénétiques pour l'étude de la mucoviscidose**

Ces analyses phylogénétiques du CFTR peuvent avoir des implications majeures pour la mucoviscidose car elles permettent d'identifier des groupes taxonomiques proches de l'homme au sein desquels le CFTR a une fonction identique. Associées aux données histologiques et immunocytochimiques, elles indiquent clairement que le lapin pourrait être un modèle plus intéressant que la souris pour les études sur la mucoviscidose. Par ailleurs, le lapin quoique plus gros que la souris, peut néanmoins être facilement manipulé dans de nombreuses animaleries, à la différence du mouton ou du singe [19] et a une durée de vie de 6 à 7 ans ce qui permet d'effectuer des bronchoscopies et des biopsies pulmonaires répétées. Le lapin représente donc un modèle d'intérêt pour l'évaluation du transfert de gène [20] ainsi que des études pharmacologiques au niveau de l'épithélium respiratoire. En outre, le ciblage du CFTR dans des cellules souches embryonnaires de lapin devrait permettre de créer un lapin mucoviscidosique. Toutefois, l'établissement de telles cellules a été pour l'instant impossible mais de nouvelles stratégies pour les obtenir sont en cours d'étude (J.P. Renard, Inra, Jouyen-Josas, communication personnelle). Nous avons également montré que la séquence nucléotidique de l'exon 10 du lapin était 100% identique à celle de l'homme dans la région entourant la phénylalanine 508 (F508) [5] comme cela avait déjà été montré pour des membres des rongeurs et des Artiodactyles [21]. Ainsi, il devrait donc être possible de créer un modèle de mucoviscidose  $\Delta F508$ , qui est la mutation la plus fréquemment rencontrée chez l'homme. En ce qui concerne l'existence d'un

mutant spontané au niveau de la F508, une recherche a été entreprise sur une centaine de lapins représentatifs des lignées françaises mais s'est avérée négative (C. Lapoumèroulie, P. Coudert, E. Denamur, résultats non publiés). Outre les études sur le poumon, un tel modèle devrait être utile pour des études portant sur l'intestin et le pancréas car le gène CFTR est exprimé chez le lapin adulte au niveau de ces organes [18, 22]. En conclusion, l'approche phylogénétique du CFTR que nous avons utilisée nous a permis de montrer que le lapin était plus proche de l'homme que ne le sont les rongeurs, et que le développement d'un modèle lapin présente un intérêt potentiel majeur pour les études physiopathologiques et thérapeutiques dans la mucoviscidose. L'utilisation de cellules somatiques de lapin, selon le modèle qui a rendu célèbre la brebis Dolly [25, 26], permettra-t-il de pallier l'absence de cellules souches ES disponibles chez le lapin? En effet, on peut envisager de réaliser l'inactivation du gène CFTR sur une cellule somatique de lapin, puis de tenter de produire un embryon en transférant le noyau d'une telle cellule modifiée dans un ovocyte énucléé... A suivre ■

### **RÉFÉRENCES**

1. Welsh MJ, Tsui LC, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 3799-876.
2. Wilson JM. Gene therapy for cystic fibrosis: challenges and future directions. *J Clin Invest* 1995; 96: 2547-54.
3. Pavirani A, Schatz C, Mehtali M. Thérapie génique de la mucoviscidose par transfert adéno-viral du gène CFTR. *Med Sci* 1996; 12: 25-33.
4. Wynshaw-Boris A. Model mice and human disease. *Nature Genet* 1996; 13: 259-60.
5. Vuillaumier S, Kaltenboeck B, Lecointre G, Lehn P, Denamur E. Phylogenetic analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in mammalian species argues for the development of a rabbit model for cystic fibrosis. *Mol Biol Evol* 1997 (sous presse).
6. Denamur E, Chehab FF. Analysis of the mouse and rat promoter regions. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1089-94.
7. Vuillaumier S, Messai H, Pinta V, Kaltenboeck B, Perret C, Denamur E. Phylogene-

- tic footprinting and DNase I hypersensitivity site analysis within the CFTR promoter region reveal a cAMP response element. *Ped Pulmonol* 1995; 20: 426.
8. Li WH, Ellsworth DL, Benny JK, Chang BHJ, Hewett-Emmett D. Rates of nucleotide substitution in primates and rodents and the generation-time effect hypothesis. *Mol Phylogenet Evol* 1996; 5: 182-7.
9. Marche PN, Rebiere MC, Leguern C, Kindt TJ. Structure and expression of rabbit MHC genes. *Ann Rech Vet* 1989; 20: 361-5.
10. Isono T, Kim CJ, Seto A. Sequence and diversity of rabbit T-cell receptor gamma chain genes. *Immunogenetics* 1995; 41: 295-300.
11. Philippe H, Douzery E. The pitfalls of molecular phylogeny based on four species, as illustrated by the Cetacea/Artiodactyla relationship. *J Mam Evol* 1994; 2: 133-52.
12. Graur D, Duret L, Gouy M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* 1996; 739: 333-5.
13. Plopper CG, Mariassy AT, Wilson DN, Alley JL, Nishio SJ, Nettesheim P. Comparison of nonciliated tracheal epithelial cells in six mammalian species: ultrastructure and population densities. *Exp Lung Res* 1983; 5: 281-94.
14. Jeffery PK. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: S14-20.
15. Brezillon S, Dupuit F, Hinnrasky J, Kälén N, Tümmler B, Puchelle E. Decreased expression of the CFTR protein in remodeled human nasal epithelium from non cystic fibrosis patients. *Lab Invest* 1995; 72: 191-200.
16. Wilson DW, Plopper CG, Dungworth DL. The response of the macaque tracheobronchial epithelium to acute ozone injury. *Am J Pathol* 1984; 116: 193-206.
17. Dupuit F, Kälén N, Brezillon S, Hinnrasky J, Tümmler B, Puchelle E. CFTR and differentiation markers expression in non-CF and  $\Delta F508$  homozygous CF nasal epithelium. *J Clin Invest* 1995; 96: 1601-11.
18. McGrath SA, Basu A, Zeitlin PL. Cystic fibrosis gene and protein expression during fetal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 201-8.
19. Dupuit F, Bout A, Hinnrasky J, Fuchey C, Zahm JM, Imler JL, Pavirani A, Valerio D, Puchelle E. Expression and localization of CFTR in the rhesus monkey surface airway epithelium. *Gene Ther* 1995; 2: 156-63.
20. Flotte TR, Afione SA, Conrad C, McGrath SA, Solow R, Oka H, Zeitlin PL, Guggino WB, Carter BJ. Stable *in vivo* expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10613-7.
21. Gasparini P, Nunes V, Dognini M, Estivill X. High conservation of sequences involved in cystic fibrosis mutations in five mammalian species. *Genomics* 1991; 10: 1070-2.

## RÉFÉRENCES

22. Kopelman H, Ferretti E, Gauthier C, Goodyer PR. Rabbit pancreatic acini express CFTR as a cAMP-activated chloride efflux pathway. *Am J Physiol* 1995; 269: C626-31.
23. Swofford D. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, IL. 1993.
24. Philippe H, Germot A, Le Guyader H, Adoutte A. Que savons-nous de l'histoire évolutive des eucaryotes ? 1. L'arbre universel du vivant et les difficultés de la reconstruction phylogénétique. *Med Sci* 1995; 11 (suppl au n° 8): I-XIII.
25. Renard J. S'il te plaît, copie-moi un mouton. *Med Sci* 1997; 13: 426-7.
26. Kahn A. Cloner les mammifères... cloner les hommes. *Med Sci* 1997; 13: 428-9.

## Remerciements

Nous remercions Jacques Elion, Bernard Grandchamp, Jean Paul Renard et Pierre Couderc pour les discussions constructives que nous avons eu avec eux et leurs constants encouragements.  
Ce travail a été subventionné en partie par l'Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose (AFLM).

**Sandrine Vuillaumier**  
**Claudine Lapoumériou**  
**Pierre Lehn**  
**Erick Denamur**

*Inserm U. 458, Hôpital Robert-Debré, 48, boulevard Sérurier, 75019 Paris, France.*

**Jocelyne Hinnrasky**  
**Édith Puchelle**

*Inserm U. 314, CHR Maison-Blanche, 51092 Reims, France.*

**Guillaume Lecointre**

*Service de systématique moléculaire du muséum, GDR Cnrs 1005, muséum national d'histoire naturelle, 43, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France.*

**Bernhard Koltenboeck**

*Department of pathobiology, College of veterinary medicine, Auburn University, Auburn, AL 36849-5519, États-Unis.*

## Summary

### **Polygenetic analysis of *CFTR* gene expression in mammalian species: could the rabbit lead to a accurate CF animal model?**

Several groups have generated mouse models for CF by disrupting the mouse *CFTR* gene or, more recently, by introducing the most common mutation found in human, the  $\Delta F508$  mutation, into the mouse *CFTR* gene. Although these animals display some phenotypic features of CF patients with prominent intestinal pathology, the pulmonary and pancreatic CF manifestations are not accurately replicated. These data are in correlation with the pattern of *CFTR* expression as well as with anatomical and physiological differences in man and rodent. In order to verify an animal species which could lead to a better CF model than the today murine models, the nucleotide sequences of the *CFTR* promoter region and available cDNA of eight mammalian species representing four different orders (Primates, Artiodactylia, Lagomorpha and Rodentia) were analysed. Promoter sequence comparisons yielded two deeply separated groups, one including man, non-human primates, cow, and rabbit, and the other including the rodents. Phylogenetic analyses of *CFTR* cDNA deeply separated the rabbit from the two members of its presumed sister order of Rodentia. This unexpected rabbit-rodent divergence is corroborated by airway surface epithelium analyses. These analyses, as well as anatomical and developmental data, suggest that the rabbit provides a suitable tool for gene transfer investigations, and once rabbit embryonic cells become available, could lead to a better CF model than the today murine models by *CFTR* gene targeting.

## TIRÉS À PART

E. Denamur.