

Etude des mécanismes de régulation à distance du gène *CFTR*

Le gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) a été identifié en 1989. Vingt cinq ans après, les mécanismes contrôlant sa fine expression, sont encore mal compris. Bien qu'environ 1980 mutations aient été découvertes, il reste des patients pour qui le génotype n'a pas été établi. Les éléments de régulation, décrits au sein du promoteur, ne peuvent à eux seuls expliquer cette complexe régulation tissu spécifique. Des éléments de régulation à distance, en cis ou en trans, sont certainement impliqués dans ce contrôle d'expression. L'objectif de ce projet est de mieux décrypter les mécanismes de régulation à distance du gène *CFTR* en identifiant des séquences régulatrices éloignées, mais pouvant, par des mécanismes de repliement, interagir spécifiquement avec celui-ci. Afin d'étudier ces contacts chromosomiques, nous avons, dans un premier temps, mis au point la technique de Capture de Conformation Chromosomique (3C). Suite à cette technique, nous sommes passés à une approche à plus grande échelle, la technique de Copie Conforme de 3C (5C), qui permet de mesurer des milliers d'interactions chromatiniennes en une analyse. L'organisation spatiale d'une région d'environ 790 kb, recouvrant le gène *CFTR*, a été analysée dans des cultures primaires de cellules épithéliales nasales, exprimant le gène *CFTR* et des fibroblastes de peau, ne l'exprimant pas ou très peu. Les interactions entre les régions de ce locus et le promoteur *CFTR* ont été étudiées par séquençage nouvelle génération sur Ion PGM™. Nous avons comparé ces conformations chromatiniennes afin d'identifier des éléments de régulation spécifiques d'une expression de *CFTR*. Notre approche a été validée par l'identification de régions régulatrices précédemment décrites. De plus, nous avons mis en évidence de nouveaux contacts chromatiniens avec le promoteur *CFTR*. Ces régions semblent fortement impliquées dans la régulation de l'expression du gène *CFTR*. Grâce à la technique 3C et ses variantes, l'identification de nouvelles mutations à distance du gène pourraient expliquer des dérégulations de son expression.

Mots clés : *CFTR*, régulation transcriptionnelle, chromatine, techniques 3C / 5C

Analysis of long-range regulatory mechanisms of the *CFTR* gene

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene was identified in 1989. Twenty five years later, the regulatory mechanisms controlling its complex expression are still not fully understood. Although, almost 1980 mutations have been identified, many cases of cystic fibrosis or *CFTR* Related Disorders remain still of unknown origin. The promoter which binds transcription factors and drives some aspects of *CFTR* gene expression, cannot alone account for tissue specific control. This implicates other distal cis- or trans-acting elements in cell-type-specific regulation of *CFTR* expression. The aim of our project is to study long-range regulatory elements of the *CFTR* gene, which could interact specifically with the *CFTR* promoter by tri-dimensional folding mechanism. We first developed the Chromosome Conformation Captures (3C) approach to map these chromosomal contacts. Subsequently, we enhanced our analyses with a high-throughput adaptation of 3C: the 3C-Carbon Copy (5C) technology. This approach allows the analysis of millions chromatin interactions. Thus, we have analyzed the spatial organization of a ~790kb region, comprising the *CFTR* gene, in primary nasal epithelial cells, which express the gene, and primary skin fibroblasts, which do not express the gene. Interactions between this locus and the *CFTR* promoter have been analysed by next generation sequencing with the Ion PGM™. We have compared chromatin conformation in order to identify uncharacterized regulatory elements that act especially in *CFTR*-expressing cells. Our approach has been validated by the identification of previously characterized regulatory elements. Moreover, we identify novel chromatin contacts of the *CFTR* promoter with chromosomal regions, which could potentially be involved in *CFTR* gene expression regulation. Thanks to 3C and 3C-derived analyses, we could identify new possible mutations far from the gene, which may lead to its dysfunction by modifying the chromatin conformation or regulatory elements.

Keywords : *CFTR*, transcriptional regulation, chromatin, 3C / 5C methods