



**HAL**  
open science

# Régulation du canal chlorure ANO1 par les miARN et stratégie thérapeutique dans la mucoviscidose

Florence Sonneville

► **To cite this version:**

Florence Sonneville. Régulation du canal chlorure ANO1 par les miARN et stratégie thérapeutique dans la mucoviscidose. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066470 . tel-01504599v1

**HAL Id: tel-01504599**

**<https://theses.hal.science/tel-01504599v1>**

Submitted on 10 Apr 2017 (v1), last revised 13 Apr 2017 (v2)

**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 de Doctorat**

Université Paris VI – Pierre et Marie Curie

Spécialité Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par

**Florence SONNEVILLE**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

---

**Régulation du canal chlorure ANO1 par les miARN et stratégie  
thérapeutique dans la mucoviscidose**

---

Soutenue le  
**26 Septembre 2016**

Devant le jury composé de :

Mr le Professeur Jean-François BERNAUDIN  
Mme le Docteur Magali TAULAN  
Mme le Professeur Isabelle SERMET  
Mr le Professeur Jean-Michel SALLENAVE  
Mr le Professeur Jacques TEULON  
Mr le Docteur Kamal M. BENGUERBA  
Mr le Docteur Olivier TABARY

Président du Jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Membre invité  
Directeur de Thèse

« L'Homme est capable de faire ce qu'il est incapable d'imaginer. »

René Char

## Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury de ma thèse. Tout d'abord, le Professeur Jean-François Bernaudin qui me fait l'honneur de la présider. Je remercie également mes rapporteurs, le Professeur Isabelle Sermet et le Docteur Magali Taulan pour consacrer de leur temps à l'évaluation de ce manuscrit. Merci également Magali pour tous tes conseils et les moments de partage en congrès ou en visio-conférence. J'adresse mes remerciements à mes examinateurs, le Professeur Jean-Michel Sallenave et le Professeur Jacques Teulon, qui avait déjà accepté d'être tuteur de ma thèse, de participer à ce jury. Enfin, je remercie le Docteur Kamal Benguerba d'avoir accepté de participer à ce jury en tant que membre invité, merci pour les moments de partage et ton avis extérieur sur le monde du privé, la valorisation et le transfert de technologie.

Je souhaite remercier le Docteur Olivier Tabary, directeur de cette thèse, de m'avoir donné l'opportunité de travailler à ses côtés. Merci pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de cette thèse, merci pour ta disponibilité, tes conseils, ta gentillesse, ta présence sur le plan professionnel mais également humain. Merci encore de m'avoir fait voyager et présenter mes résultats de si nombreuses fois à travers la France et le monde : Malte, Phoenix, Dubaï... Merci aussi pour cette formidable gamelle en surf de sable qui me fait toujours rire quand j'y pense et pour les photos de Brad Pitt affichées dans le bureau pour me motiver. Je te suis reconnaissante de m'avoir permis de mener à bien ce projet, j'espère avoir été à la hauteur. Je n'aurai pas pu rêver meilleur chef et j'espère continuer à travailler avec toi. Merci infiniment pour tout ce que tu m'as apporté.

Merci au Professeur Harriet Corvol de m'avoir si bien accueillie au sein du laboratoire, merci d'être toujours souriante, de te soucier de notre bien-être et de nous permettre d'assister aux réunions staff de l'Hôpital Trousseau. Merci Philippe d'avoir refusé que je fasse mon stage de master 1 avec toi pour que je puisse revenir en master 2 et faire une thèse dans ce laboratoire, merci pour tous tes conseils, et aussi pour tous les bonbons, gâteaux, financiers... Merci Loïc d'avoir répondu à toutes mes questions et de m'avoir bien accueillie dans l'équipe, un jour je t'emprunterai peut-être tes bottes pour aller à la campagne. Merci également à Nathalie pour ton aide technique et ta bienveillance, les western-blot n'ont plus

de secret pour toi. Je remercie également les nouvelles thésardes de l'équipe : merci Anastasia pour ta joie de vivre au quotidien, ton ouverture d'esprit et toutes tes relectures attentionnées, ton œil de lynx aura su repérer les doubles espaces ; merci Lea d'avoir été une super stagiaire de master 1 (je sais que tu adores le nanodrop) et d'être devenue une super thésarde, complice de délichoc. Merci aussi à toutes les deux d'avoir fait partie de la team X-Humans, on se souviendra longtemps de ces olympiades... Plus de 10 heures pour aller à Clermont-Ferrand, nos capes de super-héros, nos exploits sportifs (ou pas), nos blessures, mais surtout le prix de la persévérance. Je vous souhaite à toutes les deux de faire de très belles thèses. Merci Pauline pour ton soutien, et merci d'avoir pris la relève sur le projet inflammation, je te souhaite également de faire une très bonne thèse. Merci aux autres membres de l'équipe (Michel, Viviane, Julie, Guillaume, Xavier, Hortense et Laura) pour leurs conseils avisés et la bonne humeur au laboratoire. Merci aussi à toutes les personnes passées dans le labo : Soumaya, merci de m'avoir fait découvrir ton si beau pays et merci à ta famille pour leur accueil si chaleureux. J'ai hâte de vous revoir. Merci Manon de nous avoir accueillis chez toi à Montréal, j'espère que tu réussiras à avoir un poste de chercheur en France. Merci Tania, miss BFM pour tous les potins échangés et le séjour à New-York. Mes remerciements vont également à Kristin pour ses leçons d'anglais et à Sarah pour sa bonne humeur permanente.

Je voudrais également remercier tous les membres de l'équipe Aucouturier, voisins de paliers pendant 3 ans pour tous les bons moments partagés.

Merci à toute l'équipe de la DGRTT de l'UPMC pour leur accueil lors de ma mission doctorale qui m'a permis de découvrir le monde de la valorisation et de me rendre compte du potentiel valorisable de nos résultats. Merci aussi à Inserm Transfert et plus particulièrement à Matthieu Collin et Hervé Coste pour leur professionnalisme et leur suivi de notre dossier.

Lyvianne, un spécial merci pour toi ! Partager les mêmes moments de galère à la fin ça rapproche encore plus, merci d'être devenue une amie au fil de ces années, je te souhaite une très bonne thèse ! Bientôt, nous serons libéréées, délivréées... Mes remerciements vont aussi à Malorie et A'dem pour leur « rayon de soleil » qui remonte le moral et merci à toutes les autres personnes du centre avec qui j'ai pu échanger pendant cette thèse.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes rencontrées avant cette thèse, merci aux amis de la fac pour tous les bons moments passés ensemble, nos vacances, les bars...

Merci à tous les amis de Saint-Quay, nos années CLJ me manquent. Merci Jeff de Bruges de m'avoir fait découvrir non seulement le vanillon, les maisons lait, le piccadilly mais aussi de m'avoir permis de faire de superbes rencontres : Isa ma chef, Julie petite chef, Delphinette, Mel' ma gueuse et Mahroufette. Amira, co-contrat étudiant et quelle étudiante ! Je suis tellement fière de toi, future cardiologue ! Merci pour tous ces moments partagés et à nous les week-ends de détente après la thèse !! Je remercie également mes chatons (Agathe, Aurel et Marie) d'être toujours présentes après toutes ces années, 9 ans qu'on a eu notre bac et qu'on faisait notre acrosport sur la panthère rose et maintenant j'ai hâte d'assister à vos mariages et de voir vos bébés.

Merci également à ma famille de cœur, je ne serai rien sans vous. Alex : mon esperluette, ma liaison esther phosphate, super binôme de TP/TD, paraaaafilm, et Sarah : ma sœur, ma demi-vahiné, mon double quand on rend fous les autres. On a partagé tellement de choses ensemble, la P1, la fac, le Portugal, la Bretagne, les cadeaux pourris, et c'est pas fini ! Merci pour tout les filles, je vous aime !

Je remercie également ma belle-famille (Martine, Thierry, Marine et Pépé) pour tous les bons moments passés ensemble. Un grand MERCI à ma famille, merci à mes grands-parents et plus particulièrement à mes parents de m'avoir encouragée, soutenue et permis d'arriver jusqu'ici. Merci Sam, et merci mon petit Valou, tu resteras toujours un bébé pour moi et je suis fière de t'avoir fait découvrir le monde de la recherche pour ton stage de 3<sup>ème</sup>. J'espère que vous serez fiers de moi.

Et parce qu'on garde le meilleur pour la fin, merci Clément. Merci de partager ma vie, merci de croire en moi depuis le début, tes encouragements, ta présence et ton amour sont de vraies forces pour moi.

# Table des matières

Avant texte.....	11
Liste des figures .....	12
Liste des tableaux .....	16
Liste des abbréviations.....	17
Avant-propos.....	22
Introduction .....	24
<b>1. La mucoviscidose .....</b>	<b>25</b>
1.1. Epidémiologie.....	25
1.2. Historique.....	27
1.3. Gène et protéine CFTR .....	28
1.3.1. Gène CFTR.....	28
1.3.2. Protéine CFTR.....	29
1.3.3. Localisation de CFTR.....	30
1.3.4. Biogénèse de CFTR .....	31
1.3.5. Fonctions de CFTR .....	32
a) CFTR : canal chlorure.....	33
b) CFTR : transporteur d'anions polyatomiques et de glutathion .....	33
c) CFTR : régulateur d'autres canaux.....	33
1.3.6. Régulation de CFTR.....	35
1.3.7. Mutations de CFTR .....	35
a) Mutations de classe I.....	36
b) Mutations de classe II.....	37
c) Mutations de classe III .....	37
d) Mutations de classe IV .....	37
e) Mutations de classe V .....	38

f) Mutations de classe VI .....	38
g) Hétérogénéité phénotypique de la mucoviscidose .....	38
<b>1.4. Diagnostic et dépistage de la mucoviscidose .....</b>	<b>39</b>
<b>1.5. Manifestations cliniques secondaires de la maladie.....</b>	<b>42</b>
<b>1.5.1. Manifestations digestives .....</b>	<b>42</b>
a) Manifestations gastro-intestinales.....	42
b) Manifestations pancréatiques.....	42
c) Manifestations hépatobiliaires.....	43
<b>1.5.2. Manifestations génitales .....</b>	<b>43</b>
<b>1.5.3. Manifestations osseuses.....</b>	<b>43</b>
<b>1.6. L'atteinte pulmonaire .....</b>	<b>44</b>
<b>1.6.1. Physiologie pulmonaire .....</b>	<b>44</b>
a) Généralités.....	44
b) L'épithélium des voies aériennes .....	45
c) Le liquide de surface des voies aériennes .....	49
<b>1.6.2. Physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose .....</b>	<b>51</b>
<b>1.7. Stratégies thérapeutiques .....</b>	<b>53</b>
<b>1.7.1. Prise en charge de l'atteinte pancréatique et digestive .....</b>	<b>53</b>
<b>1.7.2. Prise en charge de l'atteinte pulmonaire .....</b>	<b>53</b>
a) Thérapies améliorant la clairance mucociliaire.....	54
b) Thérapies anti-infectieuses .....	55
c) Thérapies anti-inflammatoires .....	55
d) La transplantation pulmonaire .....	56
<b>1.7.3. Nouvelles stratégies thérapeutiques .....</b>	<b>56</b>
a) Thérapie génique .....	56
b) Thérapie protéique .....	57
<b>2. Anoctamine 1 (ANO1) .....</b>	<b>60</b>
<b>2.1. Découverte de l'identité moléculaire des CaCC.....</b>	<b>60</b>
<b>2.1.1. La conductance chlorure activée par le calcium .....</b>	<b>60</b>
<b>2.1.2. Les candidats aux CaCC.....</b>	<b>61</b>
a) CLCA.....	61
b) CIC-3.....	62
c) Bestrophines .....	62
<b>2.1.3. Identification d'ANO1 comme CaCC .....</b>	<b>63</b>

<b>2.2. Gène et protéine ANO1</b> .....	<b>65</b>
2.2.1. La famille des anoctamines.....	65
2.2.2. Gène ANO1.....	67
2.2.3. Protéine ANO1.....	67
a) Structure de la protéine ANO1 et sites de régulation.....	68
b) Stœchiométrie d'ANO1.....	69
c) Epissage alternatif d'ANO1.....	70
d) Mécanisme d'activation d'ANO1.....	72
2.2.4. Localisation et expression d'ANO1.....	75
<b>2.3. Fonctions d'ANO1 dans les voies aériennes</b> .....	<b>76</b>
2.3.1. Apport de l'étude du modèle de souris KO pour ANO1.....	77
2.3.2. ANO1 module la sécrétion de cytokines.....	78
2.3.3. ANO1 module la sécrétion de mucines.....	79
2.3.4. ANO1 stimule la prolifération et la migration cellulaire.....	80
2.3.5. ANO1 stimule la sécrétion d'ions bicarbonates.....	81
2.3.6. ANO1 et mucoviscidose.....	81
<b>2.4. ANO1 : cible thérapeutique dans la mucoviscidose</b> .....	<b>83</b>
<b>3. Les microARN (miARN)</b> .....	<b>86</b>
<b>3.1. Généralités sur les miARN</b> .....	<b>86</b>
3.1.1. Découverte des miARN.....	86
3.1.2. Biosynthèse des miARN.....	87
a) Organisation génomique.....	87
b) Transcription du pri-miARN.....	88
c) Maturation dans le noyau en pre-miARN.....	88
d) Export dans le cytoplasme.....	90
e) Maturation cytoplasmique du pre-miARN.....	90
f) Appariement à l'ARNm cible.....	91
3.1.3. Nomenclature des miARN.....	92
3.1.4. Mode d'actions des miARN.....	92
3.1.5. Outils bio-informatiques pour la prédiction des sites cibles.....	93
3.1.6. Fonctions physiologiques des miARN.....	94
<b>3.2. MicroARN et mucoviscidose</b> .....	<b>94</b>
3.2.1. Régulation de <i>CFTR</i> par les miARN.....	94

3.2.2. Régulation de l'inflammation par les miARN .....	97
3.2.3. Régulation de l'obstruction bronchique et de l'infection.....	99
3.3. MicroARN : biomarqueurs et thérapeutiques .....	103
3.3.1. MicroARN en tant que biomarqueurs.....	103
3.3.2. MicroARN et thérapeutiques .....	105
Objectifs du travail.....	109
Résultats .....	112
1. Article .....	113
1.1. Contexte de l'étude .....	113
1.2. Résultats.....	114
1.3. Conclusion .....	116
2. Résultats complémentaires.....	142
2.1. Régulation d'ANO1 par les microARN .....	142
2.1.1. Matériel et méthodes.....	142
2.1.2. Prédictions bio-informatiques.....	143
2.1.3. Efficacité de la transfection du mimic de miR-9 .....	144
2.1.4. Spécificité de la transfection du mimic de miR-9.....	144
2.1.5. Effet de miR-9 sur ANO1 .....	145
2.1.6. Effet du miR-19a sur ANO1 .....	146
2.1.7. Effet du miR-144 sur ANO1 .....	148
2.1.8. Conclusions .....	149
2.2. Régulation de miR-9.....	150
2.2.1. Matériels et méthodes .....	150
2.2.2. Expression de miR-9 dans les explants bronchiques et le plasma.....	151
a) Explants bronchiques .....	151
b) Plasmas .....	152
2.2.3. Effet de l'IL-4 .....	153
2.2.4. Effet du ré-adressage de CFTR.....	154

2.2.5. Effet de l'inhibition de CFTR.....	154
2.2.6. Conclusions .....	155
2.3. Résultats complémentaires sur le TSB ANO1 .....	156
2.3.1. Matériels et méthodes .....	156
2.3.2. Effets dose .....	157
2.3.3. Effet du TSB sur l'inflammation.....	157
2.3.4. Effet du TSB sur la croissance bactérienne .....	158
2.3.5. Dégradation du TSB.....	159
2.3.6. Effet du TSB sur des cellules glandulaires .....	160
2.3.7. Effet du TSB sur des cellules pancréatiques .....	161
2.3.8. Conclusions.....	162
2.4. Approche globale par miRNOME .....	163
2.4.1. Matériel et méthodes.....	165
2.4.2. Expressions du miR-199a et des acteurs de la voie NF-kB.....	167
2.4.3. Régulation d'IKK $\beta$ par le miR-199a .....	169
2.4.4. Conclusions.....	172
Discussion .....	173
Références bibliographiques .....	183
Annexes .....	207
Communications Scientifiques.....	220
Liste de publications .....	221
Brevet.....	221
Communications orales dans le cadre de congrès .....	222
Communications affichées dans le cadre de congrès.....	222
Prix.....	223

Avant texte

## Liste des figures

Figure 1 : Prévalence approximative de la mucoviscidose à la naissance et principales mutations à travers le monde. ....	25
Figure 2 : Prévalence de la mucoviscidose en France par département en nombre de patients pour 100 000 habitants. ....	26
Figure 3 : Du gène à l'ARNm CFTR. ....	28
Figure 4 : Organisation structurale de la protéine CFTR. ....	30
Figure 5 : Immunomarquage du canal CFTR. ....	31
Figure 6 : Relations entre CFTR, ORCC et ENaC. ....	34
Figure 7 : Mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal CFTR. ....	35
Figure 8 : Différentes classes de mutations du gène <i>CFTR</i> . ....	36
Figure 9 : Dépistage néonatal de la mucoviscidose en France. ....	41
Figure 10 : Principales manifestations digestives chez les patients atteints de mucoviscidose. ....	43
Figure 11 : Anatomie de l'appareil respiratoire. ....	45
Figure 12 : Schéma représentant les différentes populations de cellules présentes le long de l'épithélium des voies aériennes. ....	46
Figure 13 : Cellules épithéliales des voies aériennes. ....	48
Figure 14 : Epithelium alvéolaire. ....	49
Figure 15 : Liquide de surface des voies aériennes. ....	50
Figure 16 : Schéma comparant l'épithélium pulmonaire non CF (A) et CF (B et C). ....	52
Figure 17 : Stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de l'atteinte respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. ....	54

Figure 18 : Topologie prédite des anoctamines.....	65
Figure 19 : Le gène ANO1.....	67
Figure 20 : Structure de la protéine ANO1 et localisation de ses sites de régulation. ....	69
Figure 21 : Epissage alternatif du gène <i>ANO1</i> et ses conséquences fonctionnelles.....	72
Figure 22 : Mécanisme d'activation des canaux CaCC. ....	73
Figure 23 : Expression d'ANO1 en ARN et en protéines dans différents tissus. ....	76
Figure 24 : Comparaisons de souris WT et souris KO pour ANO1. ....	78
Figure 25 : Localisation cellulaire d'ANO1.....	80
Figure 26 : L'activité et l'expression d'ANO1 sont diminuées dans la mucoviscidose. ....	83
Figure 27 : Biogénèse des miARN.....	87
Figure 28 : Organisation génomique des miARN. D'après (Kapinas and Delany 2011).....	88
Figure 29 : Maturation en pre-miARN par le complexe microprocesseur.....	89
Figure 30 : Régulation de CFTR par le miR-138.....	96
Figure 31 : Localisation des sites de liaison des miARN sur le 3'UTR de CFTR.....	97
Figure 32 : Efficacité de la transfection du mimic de miR-9. ....	144
Figure 33 : Spécificité de la transfection du mimic de miR-9.....	145
Figure 34 : Effet du mimic de miR-9 sur l'expression protéique d'ANO1. ....	146
Figure 35 : Transfection du mimic de miR-19a et effet sur le transcrit ANO1.....	147
Figure 36 : Etude de la liaison du miR-19a au 3'UTR d'ANO1. ....	147
Figure 37 : Transfection du mimic de miR-144 et effet sur le transcrit ANO1.....	148
Figure 38 : Etude de la liaison du miR-144 au 3'UTR d'ANO1.....	149
Figure 39 : Expression de miR-9 dans des explants bronchiques CF et non CF. ....	152
Figure 40 : Expression de miR-9 dans les plasmas CF et non CF.....	152

Figure 41 : Effet de l'IL-4 sur les expressions d'ANO1 et de miR-9. ....	153
Figure 42 : Effet de la température sur l'expression de miR-9. ....	154
Figure 43 : Effet de l'inhibiteur CFTR-inh172 sur l'expression de miR-9. <b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
Figure 44 : Effet dose-réponse du TSB ANO1. ....	157
Figure 45 : Effet du TSB ANO1 sur la sécrétion d'IL-8. ....	158
Figure 46 : Effet du TSB ANO1 sur la croissance bactérienne. ....	159
Figure 47 : Expérience de dégradation du TSB ANO1 dans différents fluides. ....	160
Figure 48 : Effet du TSB ANO1 sur l'activité chlorure liée à ANO1 de cellules glandulaires CF. ....	161
Figure 49 : Effet du TSB ANO1 sur l'activité chlorure liée à ANO1 de cellules pancréatiques CF. ....	162
Figure 50 : Analyse en composantes principales des données issues du transcriptome. ....	164
Figure 51 : Schéma récapitulatif d'analyse des données issues du miRNOME et du transcriptome. ....	165
Figure 52 : Expression de miR-199a dans les cellules CF et non CF. ....	167
Figure 53 : Expression du miR-199a, d'IKK $\beta$ et de l'IL-8 dans des explants bronchiques CF et non CF. ....	168
Figure 54 : Matrice de corrélation statistique de Pearson avec les valeurs de p dans les explants bronchiques CF. ....	168
Figure 55 : Transfection du mimic de miR-199a. ....	169
Figure 56 : Effet du miR-199a sur l'expression protéique d'IKK $\beta$ , de phospho I $\kappa$ B $\alpha$ et de NF- $\kappa$ B. ....	170
Figure 57 : Effet du miR-199a sur la sécrétion d'IL-8. ....	171

Figure 58 : miR-199a régule directement IKK $\beta$ . .....	171
Figure 59 : Régulation de la voie NF- $\kappa$ B par le miR-199a. ....	172

## Liste des tableaux

Tableau 1 : miARN dérégulés et leurs cibles dans le contexte CF. ....	102
Tableau 2 : Caractérisation des miARN présents dans 12 fluides biologiques. ....	104
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des miARN prédits pour cibler ANO1 d'après différentes bases de données. ....	143
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des résultats du transcriptome et du miRNOME .....	164

## Liste des abréviations

### A

AAV	<i>adeno-associated virus</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ABCC7	<i>ATP-binding cassette sub-family C member 7</i>
ADAR	<i>adenosine deaminase acting on RNA</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANO1	anoctamine 1
A01	inhibiteur pharmacologique d'ANO1
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
ATP	adénosine-5'-triphosphate

### B

BPCO	bronchopneumopathie obstructive chronique
Br <sup>-</sup>	ion bromure

### C

Ca <sup>2+</sup>	ion calcium
CaCC	canaux Cl <sup>-</sup> activés par le Ca <sup>2+</sup>
CaM	calmoduline
CaMKII	calmoduline kinase II
CC10	<i>club cell</i> 10 kDa
CF	<i>cystic fibrosis</i>
CFBD	<i>CF-related bone disease</i>
CFF	<i>cystic fibrosis foundation</i>

CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CFTR-inh172	inhibiteur fonctionnel de CFTR
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	éthanoate
Cl <sup>-</sup>	ion chlorure
CLCA	<i>chloride channel accessory</i>
CLCN3	<i>chloride channel, voltage-sensitive 3</i>
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
CRCM	centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose

## D

DAG	diacyl glycérol
ddp	différence de potentiel
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome Critical Region gene 8</i>
DIDS	<i>4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid</i>
DOG1	<i>discovered on GIST-1</i>
DTT	dithiothréitol
DUF590	<i>domain of unknown function 590</i>

## E

ECBC	examens cytobactériologiques des crachats
ECFS	<i>european cystic fibrosis society</i>
EFR	explorations fonctionnelles respiratoires
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENaC	<i>epithelial Na<sup>+</sup> channel</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>

## F

F <sup>-</sup>	ion fluorure
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>

## G

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSH	glutathion réduit
GTPase	guanosine triphosphatase

## H

HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	bicarbonate
HCV	virus de l'hépatite C
HCOO <sup>-</sup>	méthanoate

## I

I <sup>-</sup>	ion iodure
ICC	<i>interstitial cells of Cajal</i>
IFRD1	<i>interferon-related developmental regulator 1</i>
IL	interleukine
IMC	indice de masse corporelle
IP <sub>3</sub>	inositol triphosphate
IP <sub>3</sub> R	récepteur à l'inositol triphosphate

## K

kb	kilobases
kDa	kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
KSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>

## L

LGAC	<i>ligand-gated anion channel</i>
LNA	<i>locked nucleic acid</i>

## M

miARN	microARN
MBBO	<i>miRNA-binding blocker oligonucleotides</i>
MBL2	<i>mannose Binding Lectin 2</i>

MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MRE	<i>miRNA response element</i>
MUC	mucine
<b>N</b>	
n	nombre d'échantillons
Na <sup>+</sup>	ion sodium
NBD	<i>nucleotide-binding domains</i>
NFA	<i>niflumic acid</i>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitrate
<b>O</b>	
O <sub>2</sub>	dioxygène
ORAOV2	<i>oral cancer overexpressed 2</i>
ORCC	<i>outwardly rectifying chloride channel</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
<b>P</b>	
PACT	<i>protein activator of the interferon-induced protein kinase</i>
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PK	protéine kinase
PLC	phospholipase C
pS	pico siemens
<b>R</b>	
R	domaine régulateur
RCBM	<i>regulatory calmodulin-binding motif</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
ROMK	<i>renal outer medullary potassium channel</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>

## S

SDS	sodium dodécyl sulfate
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SHIP1	<i>Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
stRNA	<i>small temporal RNA</i>

## T

TAOS2	<i>tumor amplified and overexpressed sequence</i>
TGFB1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TIR	trypsine immuno-réactive
TMD	<i>transmembrane domain</i>
TMEM16a	<i>transmembrane protein 16a</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TOM1	<i>target of myb1</i>
TRBP	<i>transactivating response RNA-binding protein</i>
TSB	<i>target site blocker</i>
TTP	tristetrapoline

## U

UPR	<i>unfolded protein response</i>
UTP	uridine-5'-triphosphate
UTR	<i>untranslated region</i>

## V

VEMS	volume expiré maximal par seconde
VRAC	<i>volume-regulated anion channels</i>

# Avant-propos

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques rares, elle touche plus de 70 000 malades dans le monde dont plus de 6 000 en France. La mucoviscidose se développe dès l'enfance pour la plupart des patients et devient rapidement chronique, handicapante et engage le pronostic vital. Depuis la découverte du gène *CFTR* responsable de la maladie en 1989, d'importants progrès ont été réalisés en recherche fondamentale et clinique permettant d'améliorer la qualité de vie des patients. Cependant, les mutations de *CFTR* induisent de nombreuses conséquences physiopathologiques au niveau systémique, mais l'atteinte pulmonaire des patients reste prédominante et représente la principale cause de mortalité et morbidité.

Aujourd'hui de nombreux traitements symptomatiques existent pour traiter les patients atteints de mucoviscidose, qui ont permis d'augmenter l'espérance de vie à la naissance de 5 ans dans les années 1960 à plus de 50 ans aujourd'hui. On dénombre aujourd'hui plus de patients adultes que de patients enfants en France (Registre français de la mucoviscidose 2014). De nouveaux traitements visant à restaurer *CFTR* ont émergé ces dernières années mais l'efficacité prouvée se limite seulement à quelques mutations. Le dernier recours au stade avancé de la maladie pour tous les patients reste donc la transplantation pulmonaire.

En France, depuis 1987, l'assurance maladie a classé la mucoviscidose parmi les affections à longue durée (ALD), ce qui permet une prise en charge à 100% des patients. Près de 4500 patients atteints de mucoviscidose sont pris en charge en ALD. Le coût annuel moyen des traitements remboursés par l'assurance maladie comprenant les médicaments, les hospitalisations, les dispositifs médicaux, la kinésithérapie et les soins infirmiers, est de 21 500 euros par patient, soit plus de 110 millions d'euros pour l'ensemble des patients français (CNAM 2007).

Le nombre important de patients, la gravité de la maladie et l'importance des coûts engendrés par les traitements font de la mucoviscidose un véritable enjeu de santé publique. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est donc d'un intérêt majeur pour l'amélioration des traitements symptomatiques ou l'éventuelle mise en place d'un traitement curatif.

# Introduction

# 1. La mucoviscidose

## 1.1. Epidémiologie

La mucoviscidose ou fibrose kystique du pancréas (*cystic fibrosis* : CF) est la plus commune des maladies génétiques rares à transmission autosomale récessive rencontrée dans les populations d'origine caucasienne. Elle représente plus de 70 000 malades dans le monde (Registre de la *European Cystic Fibrosis Society* (ECFS)) dont 6 412 en France d'après le registre français de la mucoviscidose de 2014.

Présente dans toutes les populations du globe, l'incidence de la mucoviscidose varie en fonction des pays et de l'origine ethnique. Dans les populations d'origine caucasienne, l'incidence est d'un nouveau-né sur 4 700 naissances alors qu'elle est d'un nouveau-né sur 350 000 au Japon (Figure 1) (O'Sullivan and Freedman 2009).

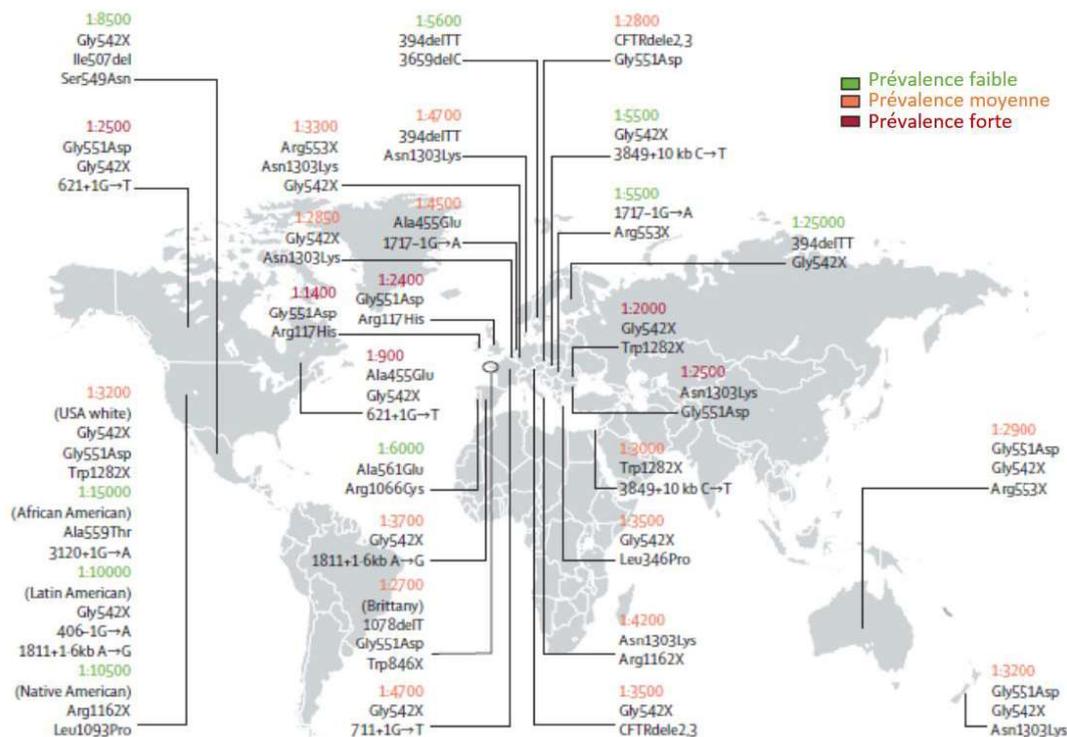
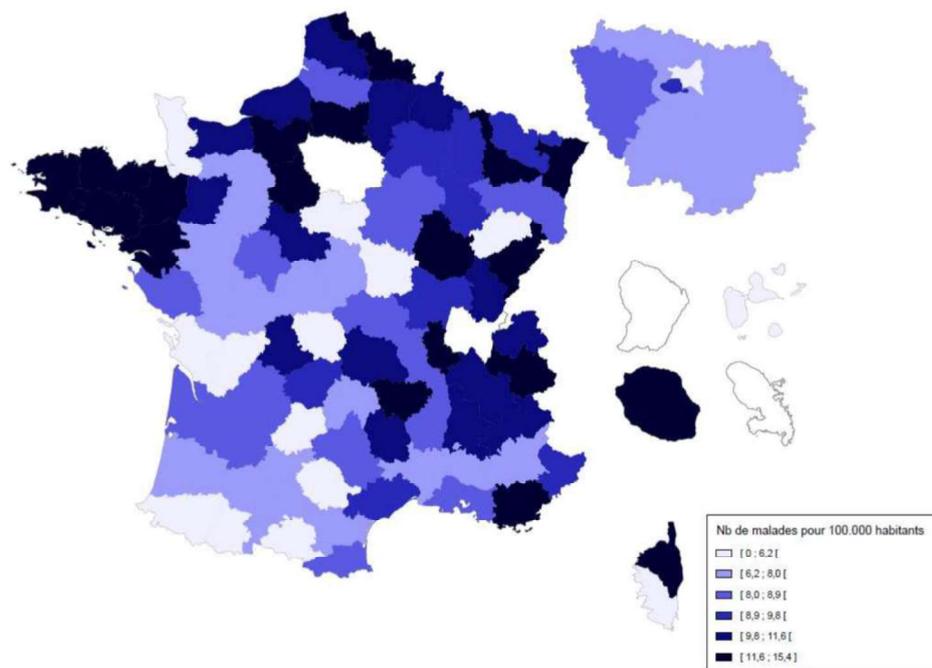


Figure 1 : Prévalence approximative de la mucoviscidose à la naissance et principales mutations à travers le monde. (D'après O'Sullivan and Freedman 2009).

La prévalence de la maladie est estimée à 0,74 pour 10 000 habitants dans l'Union Européenne (Farrell 2008).

Au sein d'un même pays, l'incidence varie également (Figure 2) : d'un nouveau-né sur 2 500 en Bretagne, elle est d'un nouveau-né sur 10 000 dans le sud-ouest de la France (Girodon-Boulandet and Costa 2005).



**Figure 2 : Prévalence de la mucoviscidose en France par département en nombre de patients pour 100 000 habitants. (Registre français de la mucoviscidose 2014).**

Le sexe-ratio est proche de 1, les hommes et les femmes sont atteints avec la même fréquence par la maladie mais l'atteinte est souvent plus grave chez les femmes (O'Connor et al. 2002).

Alors que l'espérance de vie des patients était de 7 ans en 1965, elle est proche de 50 ans pour les patients qui naissent aujourd'hui grâce à l'amélioration des traitements et de la prise en charge des patients.

## 1.2. Historique

C'est en 1936 que le pédiatre suisse Guido Fanconi décrit scientifiquement la maladie connue depuis le Moyen-âge (Fanconi 1936). Welsh cite un vieil adage de l'Europe du Nord « Malheur à l'enfant chez qui un baiser sur le front a un goût salé. Il est ensorcelé et doit bientôt mourir » (Welsh and Smith 1995).

D'après Busch, une des premières descriptions médicales des lésions pancréatiques rencontrées chez les patients atteints de mucoviscidose pourrait être un rapport d'autopsie effectué aux Pays-Bas en 1595 dans lequel est décrit une patiente de 11 ans dite ensorcelée et présentant un pancréas élargi, dur et blanc (Busch 1990). En 1905, Landsteiner décrit l'iléus méconial présent chez certains enfants atteints de mucoviscidose.

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, des descriptions de familles dont les enfants présentent une diarrhée grasseuse et meurent d'infection pulmonaire sont établies. Maladie pulmonaire, diarrhée et anomalie pancréatique avec plusieurs cas dans la même famille sont alors associées.

En 1936, Fanconi décrit la maladie sous le nom de « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie ». Dorothy Hansine Andersen, en 1938, publie un article « fibrose kystique du pancréas et ses relations avec la maladie cœliaque », où elle y décrit les caractéristiques cliniques et histologiques de la maladie, notamment l'obstruction intestinale néonatale, les complications respiratoires et digestives, et les lésions histologiques spécifiques du pancréas mais relie à tort la maladie à un déficit en vitamine A.

En 1946, Handersen et Hodges suggèrent le caractère héréditaire et le mode de transmission récessif de la maladie (Andersen and Hodges 1946).

C'est en 1953 que Paul di Sant'Agnese décrit les anomalies électrolytiques dans la sueur des malades, notamment une élévation d'ions chlorures, permettant d'envisager le diagnostic de la maladie via le test de la sueur (Di Sant'Agnese et al. 1953).

En 1981, Mickael Knowles découvre le lien physiologique entre poumons, pancréas et glandes sudoripares en montrant qu'il existe chez les patients atteints de mucoviscidose une

réabsorption massive du sodium entraînant une déshydratation à la surface de l'épithélium (Knowles et al. 1981).

En 1989, Lap-Chi Tsui, Collins et Riordan isolent et séquencent le gène muté chez les patients. Les patients portent une mutation du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) localisé sur le chromosome 7 (Kerem et al. 1989, Riordan et al. 1989, Rommens et al. 1989). La fonction de canal chlorure de la protéine CFTR (produit du gène *CFTR*) fut ensuite identifiée au début des années 90, permettant d'envisager des thérapies pour les patients (Anderson et al. 1991).

### 1.3. Gène et protéine CFTR

#### 1.3.1. Gène CFTR

Le gène *CFTR* est localisé sur le bras long du chromosome 7 en position 7q31.2 (Figure 3). Ce gène est composé d'environ 250 kb (kilobases) formant 27 exons à l'origine de la synthèse d'un ARNm (acide ribonucléique messenger) de 6,5 kb (Kerem et al. 1989). Les mutations du gène *CFTR* sont responsables de la mucoviscidose.

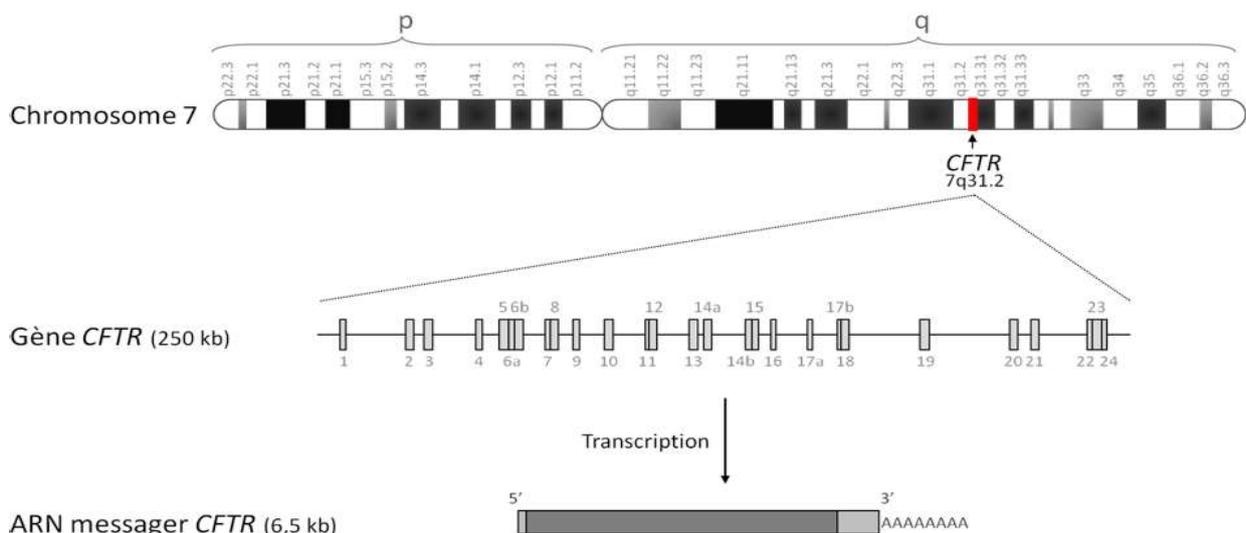


Figure 3 : Du gène à l'ARNm CFTR.

De haut en bas : Localisation du gène *CFTR* sur le chromosome 7 humain, représentation du gène *CFTR* à l'échelle faisant apparaître les exons (rectangles gris), ARN messenger *CFTR*. (D'après le schéma de Rowntree and Harris 2003).

### 1.3.2. Protéine CFTR

Le gène *CFTR* code pour une protéine du même nom. L'ARNm est traduit en protéine CFTR, glycoprotéine transmembranaire constituée de 1 480 acides aminés d'un poids moléculaire total de 168 kDa (kiloDalton) (Riordan et al. 1989, Rommens et al. 1989). La protéine CFTR appartient à la famille des transporteurs ABC (transporteurs à *ATP-Binding Cassette*), c'est pourquoi elle porte aussi le nom *ABCC7* pour *ATP-Binding Cassette sub-family C member 7*. Les transporteurs ABC forment l'une des plus grandes familles de protéines et sont très conservés entre les différents règnes du vivant. Le rôle principal des transporteurs ABC est le transport actif de nombreux substrats (acides aminés, peptides, protéines, lipides, ions, toxines, etc.) à travers la membrane plasmique et les membranes intracellulaires par hydrolyse de molécules d'ATP (adénosine-5'-triphosphate). Le transporteur ABC « type » présente deux domaines transmembranaires (TMD pour *transmembrane domains*) et deux domaines cytosoliques de liaison à l'ATP (NBD pour *nucleotide-binding domains*).

La protéine CFTR (Figure 4) est composée de :

- deux domaines transmembranaires TMD1 et TMD2 comprenant chacun six hélices  $\alpha$  hydrophobes. Ces domaines permettent la formation du pore du canal, de sélectivité anionique et de faible conductance. Dix des douze hélices  $\alpha$  contiennent un ou plusieurs acides aminés chargés positivement, favorisant en conséquence le passage d'ions chargés négativement. Les hélices 7 et 8 sont le siège de modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation.
- deux domaines hydrophiles de liaison aux nucléotides NBD1 et NBD2. Ces domaines sont formés d'un feuillet  $\beta$  entouré d'hélices  $\alpha$  et contiennent des séquences consensus de liaison à l'ATP participant à la régulation des mécanismes ATP-dépendants d'ouverture et de fermeture du canal.
- un domaine régulateur R cytoplasmique reliant les deux séquences répétées TMD-NBD. Ce domaine, spécifique de CFTR, contient de nombreux résidus chargés et les principaux sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases A (PKA) et C (PKC) (Riordan et al. 1989).

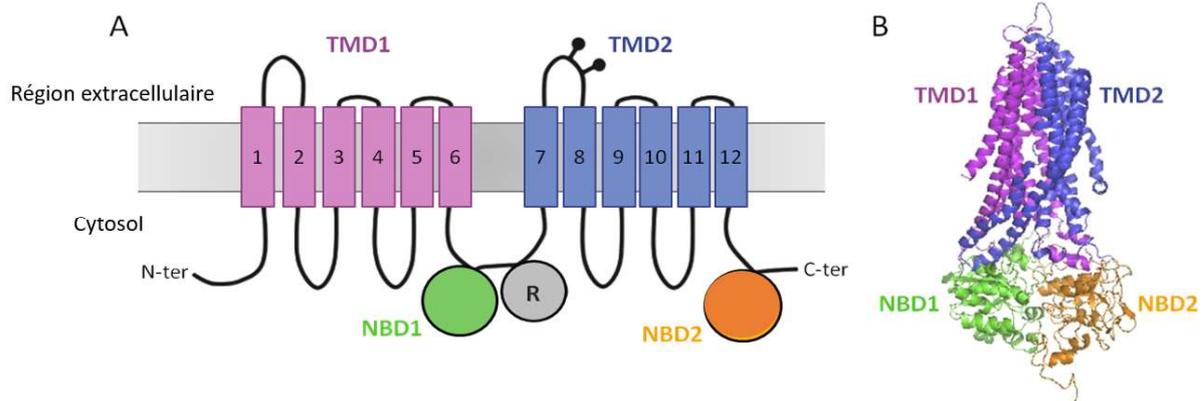


Figure 4 : Organisation structurelle de la protéine CFTR.

A) Schéma montrant l'organisation transmembranaire des différents domaines de la protéine CFTR. B) Structure prédite de la protéine CFTR humaine basée sur l'homologie avec Sav1866 d'après (Kim and Skach 2012).

### 1.3.3. Localisation de CFTR

La protéine CFTR est exprimée dans divers organes et dans de nombreux types cellulaires. CFTR est majoritairement localisée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales des organes possédant des glandes exocrines : poumons, pancréas, foie, intestins, peau et appareils génitaux (Crawford et al. 1991). La protéine CFTR est différemment exprimée selon les tissus : alors qu'elle est fortement exprimée dans l'épithélium des glandes sudoripares et pancréatiques, CFTR est faiblement exprimée au niveau bronchique (Kreda et al. 2005). Au niveau pulmonaire, la protéine CFTR est majoritairement présente au niveau de l'épithélium de surface des voies aériennes et essentiellement à la membrane apicale des cellules ciliées (Figure 5) et au niveau des glandes sous-muqueuses (Jacquot et al. 1993).



Figure 5 : Immunomarquage du canal CFTR.

CFTR est présent au niveau apical de la membrane des cellules ciliées bronchiques (CFTR en rouge, cils en vert (tubuline) et noyaux en bleu (DAPI)). (D'après Kreda et al. 2005).

#### 1.3.4. Biogénèse de CFTR

La synthèse et l'adressage de CFTR à la membrane apicale des cellules épithéliales sont réalisés par un mécanisme faisant intervenir différents compartiments et protéines intracellulaires. La transcription du gène *CFTR* en ARNm *CFTR* a lieu dans le noyau des cellules. L'ARNm est ensuite traduit en protéine qui est alors transloquée au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique (RE) où son repliement est assuré par plusieurs protéines chaperonnes (Gething and Sambrook 1992). A ce stade, les protéines mal repliées sont escortées par des protéines chaperonnes spécifiques vers la voie ubiquitine-protéasome où elles sont dégradées (Lukacs et al. 1994, Ward and Kopito 1994). Dans le réticulum endoplasmique, la biogénèse de la protéine CFTR est organisée selon différentes étapes (Pranke and Sermet-Gaudelus 2014) :

- positionnement du domaine transmembranaire TMD1 dans la membrane du RE,
- synthèse du domaine NBD1 et stabilisation de ce dernier par les protéines chaperonnes Hdj2 et HSC70,
- synthèse du domaine R qui va interagir avec la région N-terminale,

- synthèse du domaine TMD2 permettant la stabilisation des interactions NBD1/domaine R,
- formation du complexe TMD1/TMD2,
- synthèse du domaine NBD2, et
- repliement post-traductionnel nécessitant la présence d'ATP et de protéines chaperonnes cytosoliques.

Seules 30% des protéines CFTR synthétisées quittent le réticulum endoplasmique pour subir d'autres étapes de maturation dont une étape de glycosylation qui a lieu au sein de l'appareil de Golgi (Heda et al. 2001). Les glycosylations sur la quatrième boucle extracellulaire de la protéine témoignent de l'état de maturation. Il existe trois formes de protéine CFTR :

- la forme A, d'une taille de 127 kDa, nouvellement synthétisée et non glycosylée
- la forme B, d'une taille de 145 kDa, qui correspond à la forme partiellement glycosylée dans le RE et sensible à l'endoglycosidase H
- La forme C, d'une taille de 170 kDa, correspondante à la forme mature totalement glycosylée dans l'appareil de Golgi et résistante à l'endoglycosidase H. Seule cette forme mature est présente à la membrane plasmique.

Le transport des protéines CFTR matures s'effectue ensuite dans des vésicules à clathrine du Golgi à la membrane plasmique où elle acquiert sa fonction de canal chlorure avant d'être endocytée pour être recyclée ou dégradée par le lysosome (Pranke and Sermet-Gaudelus 2014).

### **1.3.5. Fonctions de CFTR**

La protéine CFTR participe à de nombreux processus biologiques.

### a) CFTR : canal chlorure

La fonction principale de CFTR est celle de canal chlorure permettant le passage d'ions chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. En 1991, Anderson et ses collègues ont mis en évidence le rôle de CFTR comme canal  $\text{Cl}^-$  sensible à l'AMP cyclique (AMPC) grâce à la réexpression de protéines CFTR sauvages fonctionnelles dans des cellules CF ou n'exprimant pas CFTR de manière endogène (Anderson et al. 1991).

La conductance aux ions  $\text{Cl}^-$  associée à CFTR présente des caractéristiques spécifiques. Le canal CFTR est très spécifique aux anions et sa séquence de perméabilité anionique est la suivante :  $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$  (Anderson et al. 1991). Cette séquence se distingue de celle des autres canaux  $\text{Cl}^-$  épithéliaux dans lesquelles l' $\text{I}^-$  est plus perméant que le  $\text{Cl}^-$ . Enfin, la conductance du canal a pu être évaluée entre 6 et 11 pS (pico Siemens) en fonction du type cellulaire, de la température et de la concentration ionique (Sheppard and Welsh 1999).

### b) CFTR : transporteur d'anions polyatomiques et de glutathion

Le canal CFTR est aussi une voie de passage pour d'autres molécules, notamment des anions polyatomiques comme le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), le bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), le méthanoate ( $\text{HCOO}^-$ ) ou l'éthanoate ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) (Linsdell et al. 1997).

Le canal CFTR semble également être perméable au glutathion réduit (GSH), tripeptide ubiquitaire retrouvé dans toutes les cellules eucaryotes. Le glutathion protège l'organisme des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Linsdell and Hanrahan 1998). Kogan et al. démontrent que le flux de GSH est une propriété intrinsèque de CFTR et que les anomalies de transport du glutathion seraient directement liées à l'anomalie génétique de CFTR (Kogan et al. 2003).

### c) CFTR : régulateur d'autres canaux

La protéine CFTR interagit et régule d'autres canaux.

Le canal sodique ENaC (*Epithelial  $\text{Na}^+$  Channel*) est régulé négativement par CFTR (Mall et al. 1998) (Figure 6). En effet, avant même l'identification du canal CFTR, une hyperabsorption de sodium ( $\text{Na}^+$ ) avait été observée dans les cellules épithéliales CF (Boucher et al. 1986).

Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'absence ou la déficience de CFTR va entraîner une levée de l'inhibition de la fonction du canal ENaC, ce qui a pour conséquence de provoquer un influx accru de  $\text{Na}^+$  vers l'intérieur des cellules, principal responsable de la déshydratation du liquide de surface des voies aériennes. Cet effet est confirmé chez la souris sur-exprimant une sous-unité du canal ENaC dans les poumons, ces souris présentent une déshydratation et une obstruction des voies aériennes par le mucus (Mall et al. 2004).

Le canal CFTR régule positivement le canal  $\text{Cl}^-$  dépendant de l'AMPc appelé ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*) (Figure 6). La présence de protéines CFTR fonctionnelles est requise pour l'activation du canal ORCC par la PKA ou l'ATP (Gabriel et al. 1993).

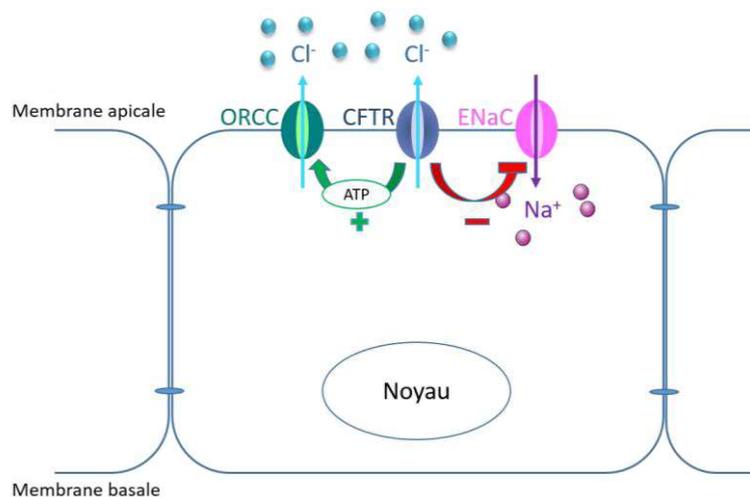


Figure 6 : Relations entre CFTR, ORCC et ENaC.

En 1996, il a été suggéré que CFTR régulerait également des canaux potassiques tels que les canaux ROMK (*renal outer medullary potassium*) principalement localisés au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales rénales (Morales et al. 1996).

Dans un modèle d'ovocytes de Xénope, il a été démontré que CFTR régulait positivement l'activité des aquaporines, protéines membranaires permettant le transport de l'eau et de solutés de part et d'autre de la membrane plasmique (Schreiber et al. 1999, Schreiber et al. 2000).

Il a de plus été suggéré que le canal CFTR régulerait l'activité d'autres canaux telle que celle des canaux  $\text{Cl}^-$  activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC) (Kunzelmann et al. 1997) et des échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (Seidler et al. 1997).

### 1.3.6. Régulation de CFTR

Au repos, le canal CFTR est inactif, il est fermé et empêche le passage d'ions  $\text{Cl}^-$  vers l'extérieur de la cellule. L'activation du canal se fait lors de la phosphorylation du domaine R par la PKA et de la liaison de molécules d'ATP au niveau des domaines NBD (El Hiani and Linsdell 2010). Dans un premier temps, une molécule d'ATP se lie au NBD1. La liaison d'une autre molécule d'ATP sur le NBD2 induit la formation d'un dimère NBD1-NBD2, à l'origine d'un changement conformationnel des domaines transmembranaires du canal. CFTR est alors ouvert et laisse passer les ions  $\text{Cl}^-$ . La fermeture du canal est provoquée par l'hydrolyse de l'ATP du NBD2 qui déstabilise le dimère NBD1-NBD2 et induit le retour à l'état de repos fermé (Figure 7).

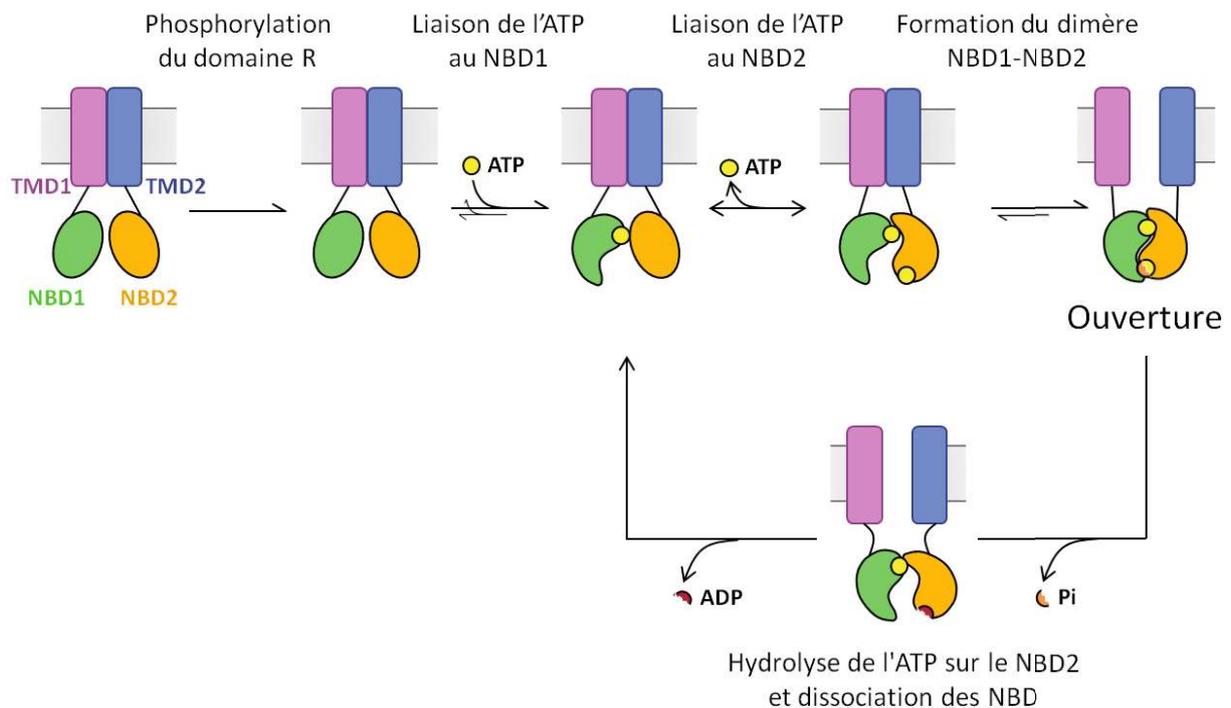


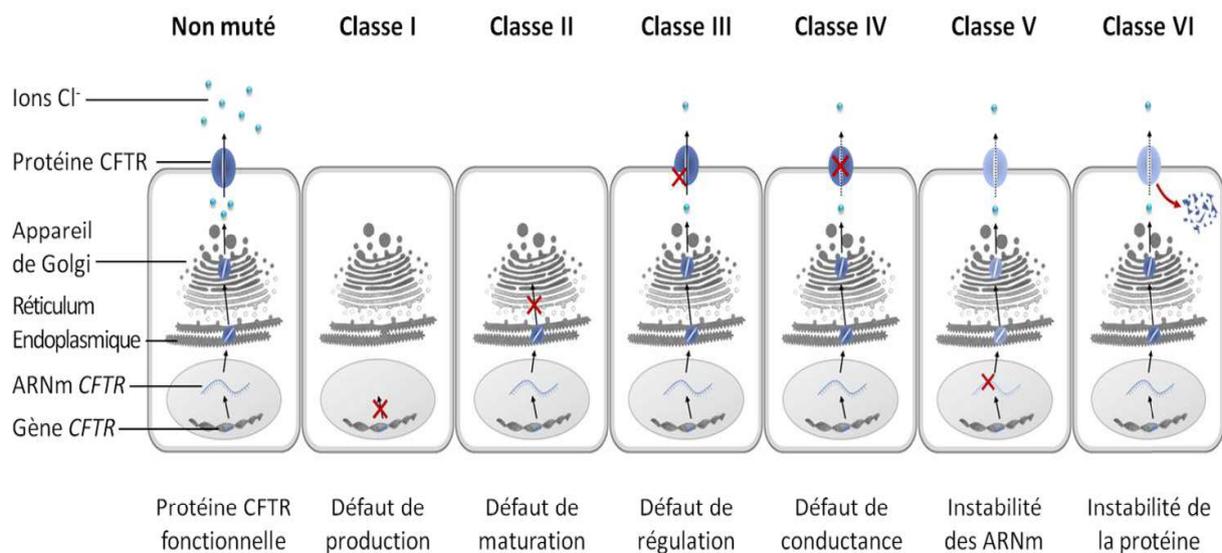
Figure 7 : Mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal CFTR.  
(D'après Gadsby et al. 2006).

### 1.3.7. Mutations de CFTR

A ce jour, 2007 mutations du gène *CFTR* ont été recensées dans la base de données *Cystic Fibrosis Mutation Database* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>). La

plupart des mutations décrites sont des mutations ponctuelles qui ont des conséquences variables sur la protéine CFTR.

Une classification des mutations (Figure 8) selon les conséquences fonctionnelles qu'elles engendrent sur la protéine CFTR a été instaurée. On dénombre actuellement six classes de mutation de *CFTR*. Les mutations des classes I à III sont associées à des phénotypes plus sévères de la maladie que les mutations des classes IV à VI.



**Figure 8 : Différentes classes de mutations du gène *CFTR*. D'après (Wilschanski and Durie 2007).**

### a) Mutations de classe I

Les mutations de classe I altèrent la production de la protéine. Elles résultent en une absence partielle ou totale de la protéine. La présence d'un codon stop prématuré (mutation non-sens G542X par exemple) conduit à la production d'un ARNm instable ou d'une courte protéine tronquée qui est non fonctionnelle et très rapidement dégradée. Le phénotype de ces patients est sévère et similaire à celui des patients porteurs de la mutation F508del, mutation la plus fréquemment rencontrée chez les patients atteints de mucoviscidose.

### **b) Mutations de classe II**

Ces mutations entraînent un défaut de maturation cellulaire de la protéine CFTR. Après la traduction, la protéine CFTR est maturée dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi avant son adressage à la membrane plasmique. Les mutations de classe II entraînent une accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique où elles vont être redirigées et dégradées dans le protéasome. Ceci se traduit par une présence très faible de protéine CFTR à la membrane plasmique. La mutation F508del est incluse dans cette classe et correspond à la délétion de la phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR par la délétion de trois nucléotides au niveau de l'exon 10 du gène. La structure tridimensionnelle de cette protéine mutée est anormale, la protéine CFTR produite est séquestrée dans le réticulum endoplasmique et non adressée à la membrane plasmique. Les patients français sont homozygotes à 42,1% et hétérozygotes à 39,4% pour la mutation F508del (Registre français de la mucoviscidose 2014). Ainsi, plus de 80% des patients français sont porteurs d'au moins une copie de cette mutation.

### **c) Mutations de classe III**

Ces mutations altèrent la régulation du canal chlorure. Les mutations de classe III sont correctement synthétisées et localisées, mais affectent les domaines de liaison à l'ATP (NBD 1 et 2), la probabilité d'ouverture du canal est alors faible. La mutation faux-sens G551D est une mutation de classe III.

### **d) Mutations de classe IV**

Les mutations de classe IV altèrent la conductance du canal chlorure CFTR. La protéine CFTR est correctement formée et adressée à la membrane plasmique mais le flux d'ions et la sélectivité ionique du canal sont modifiés. Les exemples types de mutations de classe IV sont les mutations R117H et R334W.

### e) Mutations de classe V

Ces mutations altèrent la stabilité de l'ARNm codant pour la protéine CFTR. Les quantités d'ARNm et donc de protéines adressées à la membrane plasmique résultant de ces ARNm instables sont diminuées.

### f) Mutations de classe VI

Les mutations de classe VI altèrent la stabilité de la protéine CFTR mature au niveau membranaire. La protéine, correctement adressée à la membrane plasmique des cellules épithéliales, est rapidement internalisée puis dégradée dans le protéasome.

### g) Hétérogénéité phénotypique de la mucoviscidose

Les mutations de classe I à III sont dites sévères et les mutations de classe IV à VI sont dites modérées ou peu sévères. La présence d'une mutation sévère sur chacun des deux allèles conduit à des formes sévères et classiques de la maladie, associées à une insuffisance pancréatique exocrine. L'association d'une mutation modérée et d'une mutation sévère ou la combinaison de deux mutations modérées sont associées à des phénotypes moins sévères. Cependant, pour deux patients porteurs des mêmes mutations, les profils cliniques peuvent être très différents (Cutting 2005). Au sein d'une même fratrie, des phénotypes différents peuvent être observés mettant en évidence le fait que l'environnement n'est pas le seul facteur jouant sur le phénotype de la maladie (Vanscoy et al. 2007). En effet, il est maintenant reconnu que des variants génétiques ou polymorphismes, les « gènes modificateurs », situés à l'intérieur ou en dehors du locus de *CFTR*, influencent l'expression phénotypique de la mucoviscidose (Corvol et al. 2015). Les gènes modificateurs pourraient influencer la sévérité de la maladie de façon positive (gènes modificateurs protecteurs) ou négative (gènes modificateurs défavorables).

Pour identifier les gènes modificateurs impliqués dans la mucoviscidose, deux approches ont été développées :

- une approche gène candidat qui se base sur les connaissances de la physiopathologie de la maladie et comporte des effectifs de patients limités.

- une approche globale par analyse du génome entier (*genome wide association analysis* (GWAS)) avec formation de consortiums internationaux de recherche des gènes modificateurs incluant de larges cohortes de patients.

L'atteinte pulmonaire est le principal facteur de sévérité de la mucoviscidose. En utilisant l'approche gène candidat, différents gènes modificateurs influençant la sévérité de l'atteinte respiratoire chez des patients atteints de mucoviscidose ont été identifiés : le *transforming growth factor beta 1* (TGF-β1), la *mannose binding lectin 2* (MBL 2) et l'haplotype ancestral 8.1AH (Corvol et al. 2015). Il a par exemple été montré que des variants entraînant une augmentation de l'expression de la protéine TGF-β1 étaient associés à une fonction respiratoire plus altérée. L'approche globale, utilisée par le consortium nord-américain, a permis de mettre en évidence sept régions probablement associées à la sévérité de l'atteinte pulmonaire.

L'identification des gènes modificateurs impliqués dans la mucoviscidose permettrait à long terme de proposer une médecine personnalisée, prédictive et préventive afin d'accéder à une meilleure prise en charge des patients.

## 1.4. Diagnostic et dépistage de la mucoviscidose

Les mutations du gène *CFTR* sont transmises de manière autosomique récessive.

Le diagnostic de mucoviscidose peut-être évoqué sur des enfants mais également sur des adultes présentant des signes cliniques évocateurs tels que des problèmes respiratoires, digestifs ou de fertilité. En 1998, lors de la conférence de consensus américaine, Roseinstein et Cutting définissent une association de critères diagnostiques de mucoviscidose :

- signes cliniques évocateurs, antécédents de mucoviscidose dans la fratrie,
- test de la sueur positif à deux reprises et/ou
- présence de deux mutations du gène *CFTR*.

La France, fut en 2002, le premier pays à instaurer le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose *via* le test de Guthrie effectué sur les nourrissons permettant une prise en

charge précoce de la maladie (Farriaux et al. 2003). Le dépistage néonatal (Figure 9) repose sur le dosage de la trypsine immunoréactive (TIR) dans le sang du nouveau-né prélevé au 3<sup>ème</sup> jour de vie. Un dosage anormalement élevé de TIR ( $TIR > 60 \mu\text{g/L}$ ) reflète une obstruction des voies pancréatiques. Le dosage de la TIR permet de détecter 95 à 98% des nouveaux-nés atteints de mucoviscidose, cependant la spécificité de ce test est insuffisante, ainsi, si le dosage est positif, une analyse moléculaire des principales mutations du gène *CFTR* doit être effectuée chez le nourrisson et trois cas de figures peuvent se présenter :

- deux mutations du gène sont identifiées. Le nouveau-né et ses parents sont convoqués dans un centre de ressources et compétences en mucoviscidose (CRCM) pour une confirmation du diagnostic reposant sur l'évaluation clinique et un test de la sueur positif, ainsi que pour la mise en place du traitement et du suivi.
- une mutation du gène est identifiée. Le test de la sueur doit être réalisé dans un centre spécialisé et si le test est positif, l'enfant sera suivi par les CRCM.
- aucune mutation n'est retrouvée. Un second dosage de TIR est réalisé à 21 jours de vie. Si le dosage est toujours positif, le test de la sueur sera réalisé.

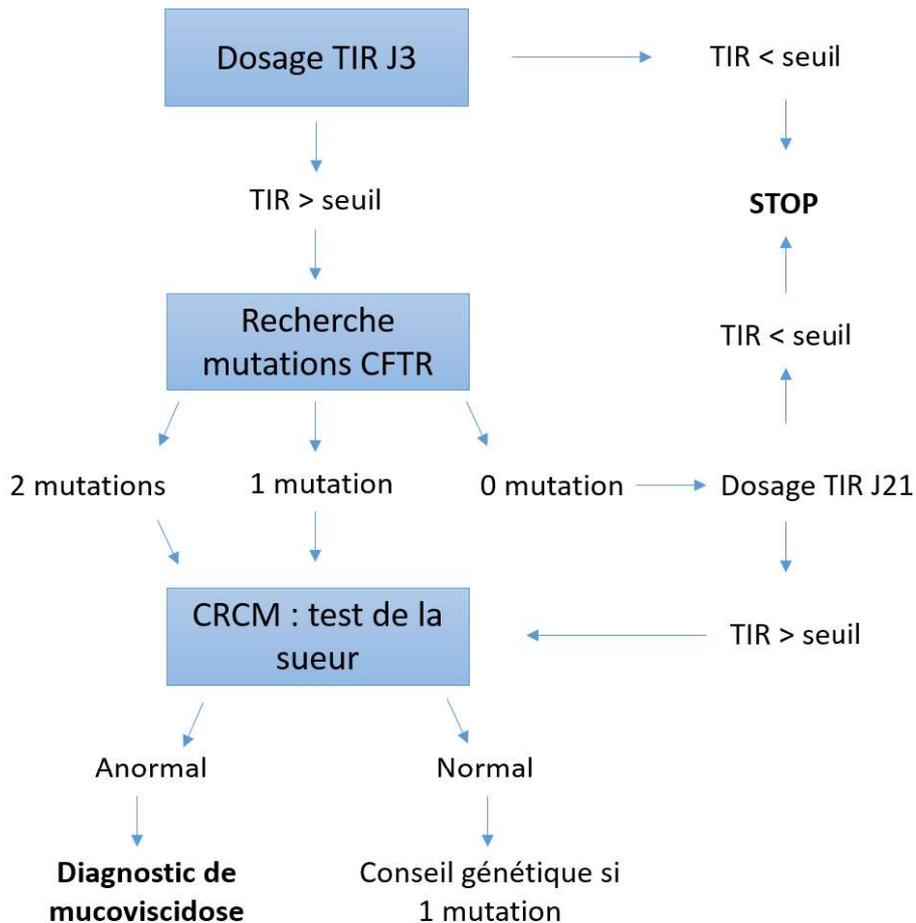


Figure 9 : Dépistage néonatal de la mucoviscidose en France.  
(TIR : trypsine immunoréactive d'après (Munck and Roussey 2008)).

Le test de la sueur proposé dès 1953 par Di Sant'Agnesse pour le diagnostic de la mucoviscidose consiste à doser la concentration d'ions  $\text{Cl}^-$  dans la sueur des patients (Di Sant'Agnesse et al. 1953). Les patients CF présentent une sueur salée due à une augmentation importante d'ions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$ , la déficience de CFTR entraînant une absence ou une diminution de l'absorption d'ions  $\text{Cl}^-$  par les cellules des glandes sudoripares. Une concentration inférieure à 40 mmol/L est considérée comme normale, supérieure à 60 mmol/L pathologique et entre les deux douteuse et nécessite donc un nouveau test de la sueur et une recherche plus large des mutations de *CFTR* (registre français de la mucoviscidose 2014) (Sermet-Gaudelus et al. 2010).

Pour l'identification de patients atteints de formes atypiques avec des tests de la sueur intermédiaires, un autre test peut être utilisé : la mesure de la différence de potentiel (ddp)

transépithélial nasal. Le transport des ions à travers l'épithélium nasal entraîne une différence de potentiel qu'il est possible de mesurer de manière simple et peu invasive *in vivo*. Chez des patients sains, la ddp se situe autour de -20 mV alors qu'elle est de -45 mV chez les patients atteints de mucoviscidose (Sands 2013).

Le dépistage prénatal de la mucoviscidose est proposé aux couples dont les deux membres sont hétérozygotes pour le gène *CFTR* et ayant déjà eu un enfant atteint de mucoviscidose. Si l'enfant est atteint de la maladie, une interruption de grossesse peut être envisagée.

## 1.5. Manifestations cliniques secondaires de la maladie

La protéine CFTR est exprimée à la membrane apicale des cellules des épithélia sécréteurs. La mucoviscidose est donc une maladie multi-organes à l'origine de conséquences observées au niveau des voies respiratoires et digestives, du tractus génital et des glandes sudoripares. Malgré une atteinte respiratoire prédominante, cause majeure de mortalité et morbidité des patients, les manifestations sont très variables d'un patient à l'autre, y compris au sein d'une même famille.

### 1.5.1. Manifestations digestives

#### a) Manifestations gastro-intestinales

Un des premiers symptômes observés est l'iléus méconial présent chez 15 à 20% des nouveaux-nés atteints de mucoviscidose, et se traduisant par l'absence d'émission du méconium au cours des premiers jours de vie (Ooi and Durie 2016) (Figure 10).

#### b) Manifestations pancréatiques

Une insuffisance pancréatique exocrine liée à un défaut de sécrétion de trypsine et de lipase dans la lumière intestinale est observée chez la majorité des patients atteints de mucoviscidose (Dodge and Turck 2006) (Figure 10). L'insuffisance pancréatique est responsable d'un défaut d'absorption des graisses, des protéines et des vitamines

liposolubles (A, D, E et K) entraînant une stéatorrhée et un retard de croissance staturo-pondérale.

### c) Manifestations hépatobiliaires

L'atteinte hépatobiliaire est la deuxième cause de mortalité des patients atteints de mucoviscidose, elle est fréquente mais n'évolue vers la cirrhose biliaire que dans 10 à 15% des cas. Cette atteinte se traduit par une augmentation de la viscosité de la bile puis par une obstruction à l'évacuation de cette dernière dans les canaux hépatiques vers la vésicule biliaire (O'Sullivan and Freedman 2009) (Figure 10).

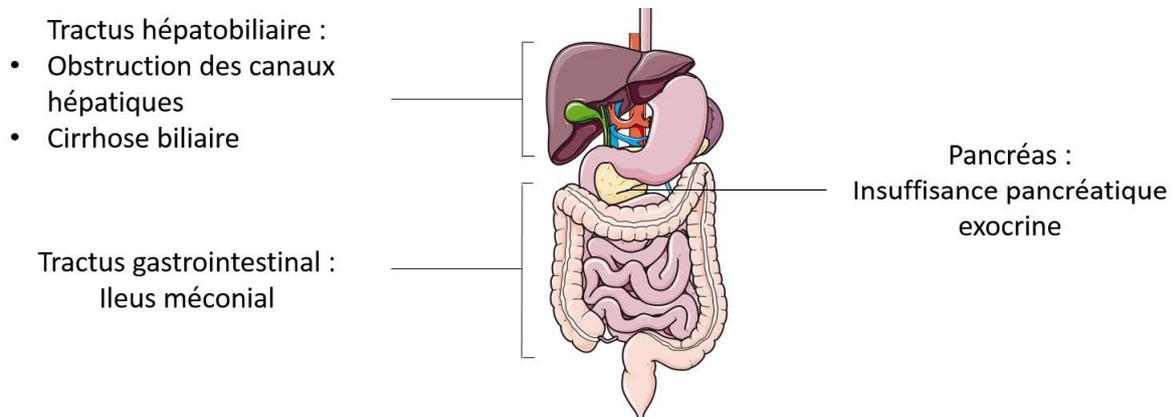


Figure 10 : Principales manifestations digestives chez les patients atteints de mucoviscidose.

### 1.5.2. Manifestations génitales

Les femmes sont, en général, fertiles bien que certaines présentent une hypofertilité liée à une hyperviscosité de la glaire cervicale (Kotloff et al. 1992). Plus de 95% des hommes atteints de mucoviscidose sont infertiles. Cette stérilité résulte d'une azoospermie causée par une malformation congénitale des canaux déférents (Wong 1998).

### 1.5.3. Manifestations osseuses

En plus d'être présent au niveau des cellules épithéliales, il a été montré que CFTR était exprimé dans les cellules osseuses humaines (ostéoblastes et ostéoclastes) (Le Heron et al. 2010, Jacquot et al. 2016). Des cas d'ostéopénie et ostéoporose ont ainsi été rapportés chez des enfants, adolescents et adultes atteints de mucoviscidose. La prévalence de la maladie

osseuse, aussi appelée CFBD (*CF-related bone disease*) augmente avec l'âge chez les patients : alors que 5% des enfants CF présentent une CFBD, environ 60% des adultes de plus de 45 ans sont affectés (Paccou et al. 2010). Les mécanismes physiopathologiques de cette fragilisation osseuse sont nombreux, dont l'insuffisance pancréatique exocrine associée à une malabsorption, le déficit protéino-calorique, le déficit en vitamine D et K, l'inflammation chronique, mais de nombreux travaux récents impliquent le déficit fonctionnel de CFTR dans l'altération de l'activité ostéoblastique présente au cours de la mucoviscidose (Jacquot et al. 2016).

## 1.6. L'atteinte pulmonaire

Chez les patients atteints de mucoviscidose, les manifestations pulmonaires sont la cause majeure de morbidité et mortalité des malades. Les manifestations des voies respiratoires sont notamment caractérisées par la présence de polypes nasaux, de pansinusites et toux chroniques, de bronchectasies, d'exacerbations pulmonaires, d'obstruction des voies respiratoires par un mucus visqueux, et d'infections récurrentes liées à la présence de pathogènes opportunistes tels que *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Amaral 2015).

Afin de mieux comprendre les conséquences de la déficience de CFTR sur l'appareil respiratoire, je ferai une description détaillée de son organisation anatomique et de son histologie.

### 1.6.1. Physiologie pulmonaire

#### a) Généralités

L'appareil respiratoire (Figure 11) est anatomiquement composé de deux parties, les voies aériennes supérieures et inférieures.

Les voies aériennes supérieures regroupent :

- la cavité nasale,
- la cavité buccale,
- le pharynx et

- le larynx.

Les voies aériennes inférieures rassemblent :

- la trachée,
- les bronches et
- les bronchioles.

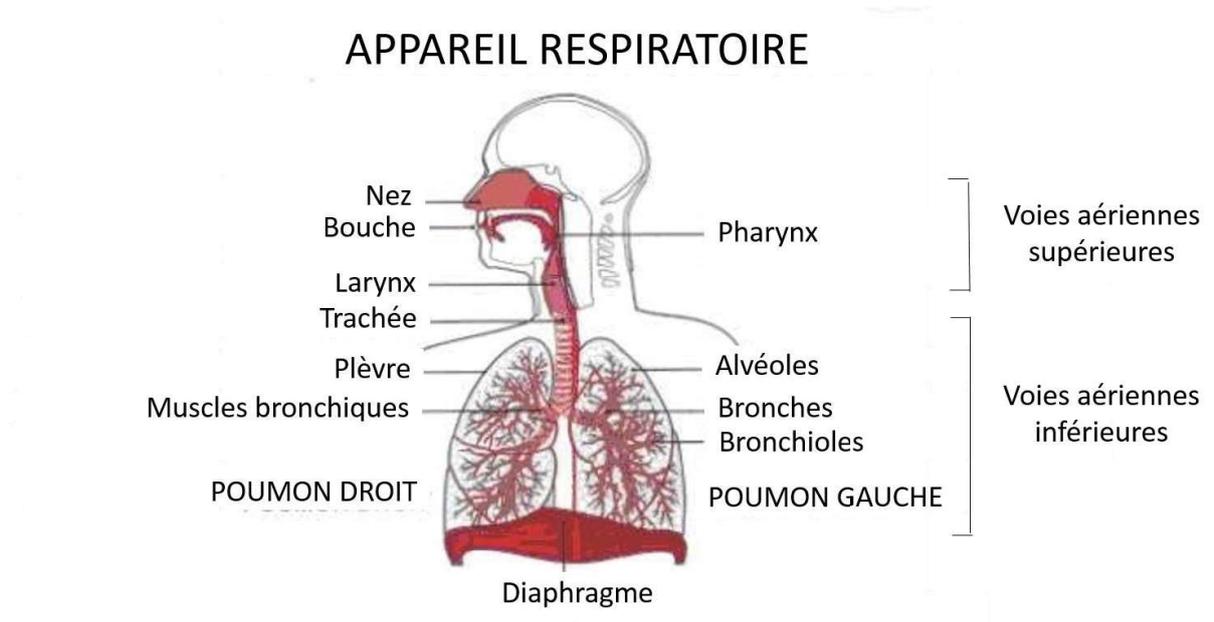


Figure 11 : Anatomie de l'appareil respiratoire.

(D'après <http://www.coursmedecine.com/physiologie/cours-physiologie/lappareil-respiratoire-les-organes-des-voies-respiratoires-superieures>).

L'appareil respiratoire comporte une portion conductrice de l'air et une portion respiratoire. La portion conductrice, des cavités nasales aux bronchioles terminales, a pour fonction la conduction et le conditionnement de l'air. La portion respiratoire composée des alvéoles constitue la zone des échanges gazeux entre l'air et le sang au niveau de la barrière alvéolo-capillaire.

#### b) L'épithélium des voies aériennes

Un épithélium est un tissu formé d'une ou plusieurs couches de cellules juxtaposées et solidaires recouvrant la surface externe ou les cavités internes de l'organisme. Les cellules épithéliales sont séparées du tissu conjonctif sous-jacent par la lame basale (Figure 12).

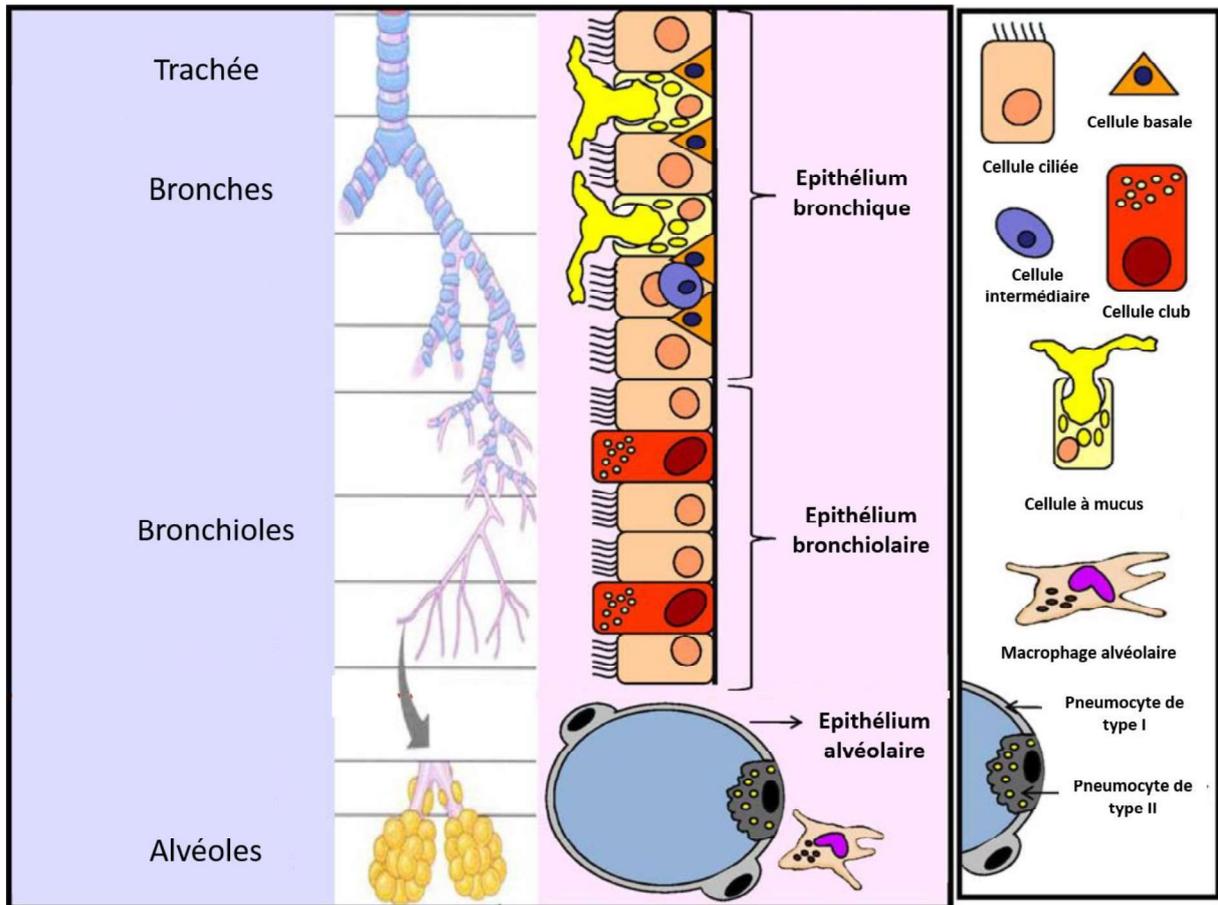


Figure 12 : Schéma représentant les différentes populations de cellules présentes le long de l'épithélium des voies aériennes.  
(D'après Berube et al. 2010).

Le rôle principal de l'épithélium des voies aériennes est d'assurer la protection de la muqueuse respiratoire vis-à-vis des pathogènes inhalés. La nature de l'épithélium change en fonction de son emplacement. De la trachée aux bronches, la lumière des voies aériennes est recouverte d'un épithélium pseudo-stratifié puis un épithélium cuboïde simple est retrouvé au niveau des bronchioles terminales. Les alvéoles sont recouvertes d'un épithélium simple.

L'épithélium des voies aériennes et respiratoires est constitué de différentes populations cellulaires épithéliales (Figure 13) assurant chacune des fonctions différentes.

#### *Les cellules ciliées*

Les cellules ciliées sont les plus abondantes de l'épithélium des voies aériennes, représentant plus de 50% des cellules épithéliales des voies aériennes. 200 à 300 cils

vibratiles par cellule sont observés au pôle apical des cellules ciliées ainsi que de nombreuses mitochondries permettant la production d'ATP nécessaires au battement ciliaire (Sleigh et al. 1988). Les cils battent de façon synchrone afin d'évacuer le mucus qui tapisse l'épithélium pulmonaire vers le système digestif, c'est ce qu'on appelle la clairance mucociliaire (Knight and Holgate 2003).

#### *Les cellules à mucus*

Les cellules à mucus ou cellules caliciformes contiennent des granules clairs aux électrons en microscopie électronique contenant des mucines, à l'origine de la formation de mucus. Le mucus a pour fonction d'enrober les poussières, les débris cellulaires et tout organisme potentiellement pathogène qui seront éliminés grâce à la clairance mucociliaire.

#### *Les cellules séreuses*

Les cellules séreuses sont présentes au sein des glandes sécrétrices. Elles présentent un réticulum endoplasmique granuleux très développé mais contrairement aux cellules à mucus, très peu de granules denses aux électrons. Elles sécrètent des protéines de défense comme les anti-protéases.

#### *Les cellules club*

Les cellules club, anciennement cellules de Clara (Winkelmann and Noack 2010), sont principalement localisées au niveau de l'épithélium bronchiolaire et présentent des granules denses aux électrons. Elles sécrètent notamment les protéines A et B du surfactant alvéolaire et la protéine CC10 (*Club Cell 10 kDa*) qui joue un rôle anti-inflammatoire (Singh and Katyal 1997).

#### *Les cellules neuroendocrines*

Les cellules neuroendocrines (cellules de Feyrter ou de Kultchinsky) sont présentes en très faible quantité au niveau de la lame basale de l'épithélium et ont souvent une prolongation cytoplasmique étroite vers la lumière des voies aériennes (Weichselbaum et al. 2005). Ces cellules produisent différents peptides et neuropeptides régulant le tonus des muscles lisses proximaux, l'activité ciliaire et la production de mucus.

### Les cellules basales

Les cellules basales, présentes tout le long de l'épithélium pulmonaire (Evans and Plopper 1988), sont ancrées à la lame basale par des hémidesmosomes (Evans et al. 1990). Elles forment une barrière physique entre la lumière des voies aériennes et la membrane basale. Les cellules basales sécrètent des cytokines et interviennent lors des processus de régénération et réparation de l'épithélium respiratoire.

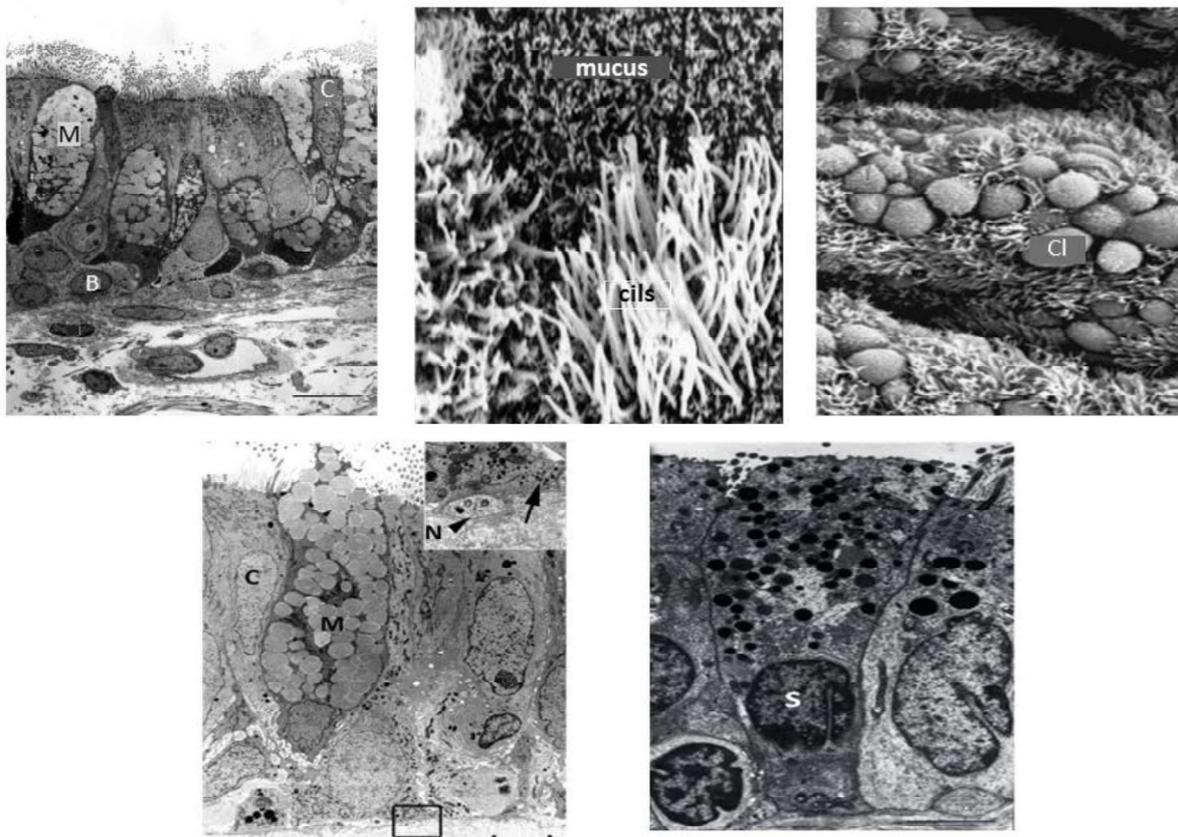


Figure 13 : Cellules épithéliales des voies aériennes.

Microscopie électronique à transmission montrant des cellules ciliées (C), basales (B), à mucus (M), séreuses (S), club (de Clara) (Cl) et neuroendocrines (N). D'après (Moran 1988, Jeffery and Li 1997, Gibson 2002, Ross 2006, Berube et al. 2010).

Les alvéoles, situées à l'extrémité des bronchioles, sont le siège des échanges gazeux entre l'air et la circulation sanguine. Deux principaux types cellulaires bordent les alvéoles : les pneumocytes de type I et de type II (Figure 14).

### *Les pneumocytes de type I*

Les pneumocytes de type I sont très larges et aplatis, ils couvrent environ 95% de la surface épithéliale alvéolaire. Leur fonction est de couvrir complètement l'alvéole d'un épithélium afin de faciliter les échanges gazeux.

### *Les pneumocytes de type II*

Les pneumocytes de type II de forme cuboïde, présentent des microvillosités au niveau apical. Bien qu'ils recouvrent seulement 5% de la surface épithéliale alvéolaire, les pneumocytes de type II représentent 60% des cellules épithéliales alvéolaires (Castranova et al. 1988). Ces cellules contiennent de nombreux corps lamellaires, caractéristiques de la cellule, qui synthétisent le surfactant pulmonaire.

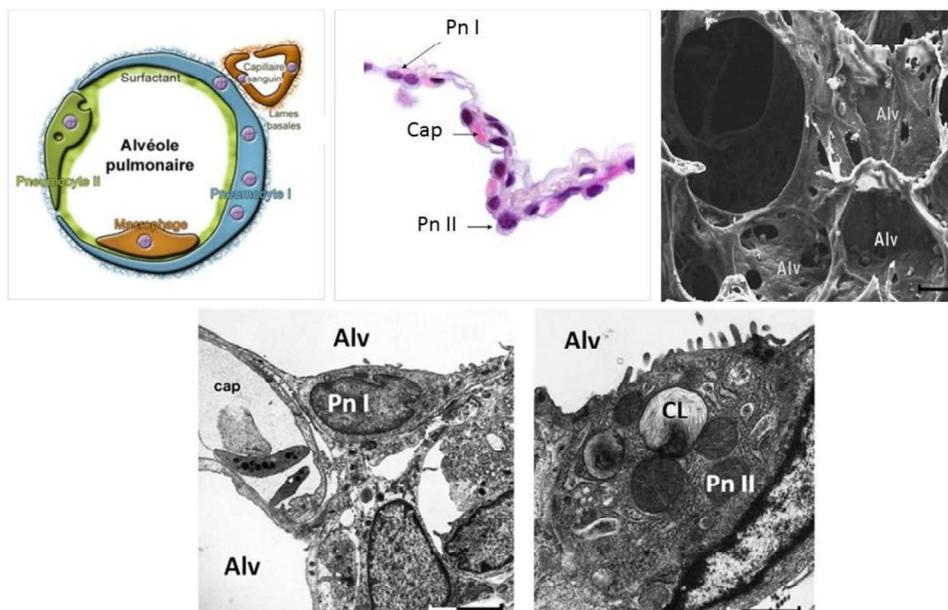


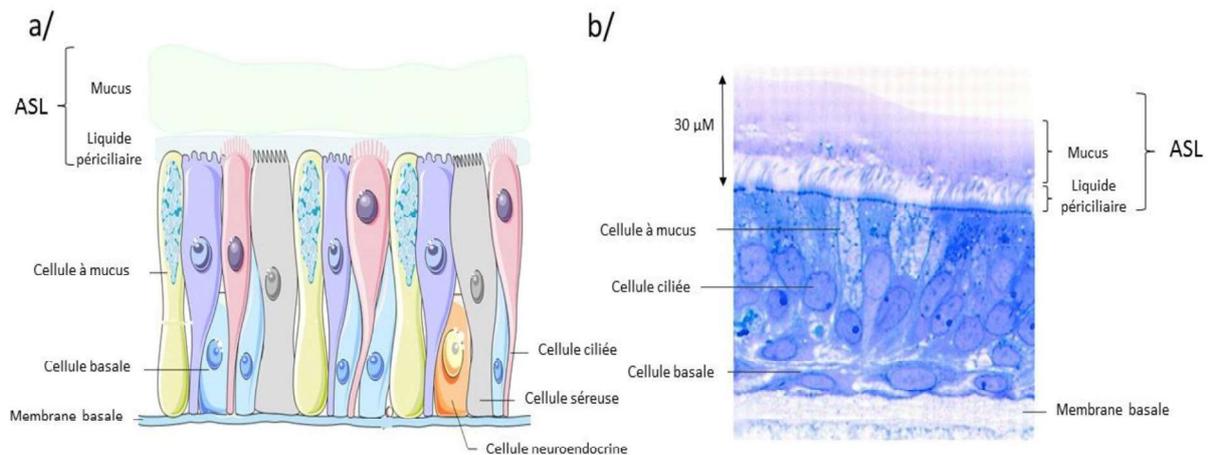
Figure 14 : Epithélium alvéolaire.

Représentation schématique et images de microscopie optique représentant l'épithélium alvéolaire (Alv : alvéoles, cap : capillaires, Pn I : pneumocytes I, Pn II : pneumocytes II) d'après pneumopathie-intersitelle.fr, (Gibson, 2002 ; Glowacka et al., 2011).

### **c) Le liquide de surface des voies aériennes**

Le liquide de surface des voies aériennes recouvre l'épithélium des voies aériennes. Il évite la déshydratation du tissu pulmonaire et piège les particules inhalées pour les évacuer vers l'appareil digestif grâce aux battements synchronisés des cils des cellules ciliées. Ce

mécanisme est appelé clairance mucociliaire. Le liquide de surface des voies aériennes est composé de deux couches : le mucus et le liquide périciliaire sur lequel repose le mucus (Figure 15).



**Figure 15 : Liquide de surface des voies aériennes.**

**a/ Représentation schématique du liquide de surface des voies aériennes (ASL) d'après servier medical art. b/ Image de microscopie optique d'une culture de cellules épithéliales bronchiques humaines cultivées en interface air-liquide d'après (Matsui et al. 1998).**

Le liquide périciliaire est une couche aqueuse de faible viscosité d'environ 7 µm de hauteur dans laquelle battent les cils vibratiles permettant ainsi le déplacement du mucus. Ce liquide est généré par des mouvements d'eau induits par des mouvements ioniques transépithéliaux (Sleigh et al. 1988).

Le mucus, produit par les cellules à mucus et les cellules séreuses, est plus dense. Il est composé de 95% d'eau, 2 à 3% de protéines et glycoprotéines (dont les mucines), 1% de lipides et 1% de minéraux et ions. Il contient également des peptides antimicrobiens, des anti-oxydants et des anti-protéases qui participent à la défense de l'épithélium des voies aériennes.

L'épithélium alvéolaire est recouvert par le surfactant composé de 85 à 90% de lipides, de 10% de protéines et 2% de carbohydrates. Le surfactant a deux rôles, le principal étant d'empêcher le collapsus alvéolaire en fin d'expiration en réduisant la tension de surface des alvéoles lors de l'inspiration. Le surfactant possède un second rôle important dans la défense

immunitaire en stimulant la phagocytose et la capacité de migration des macrophages alvéolaires.

### 1.6.2. Physiopathologie pulmonaire de la mucoviscidose

La déficience de CFTR est à l'origine de la diminution de la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose.

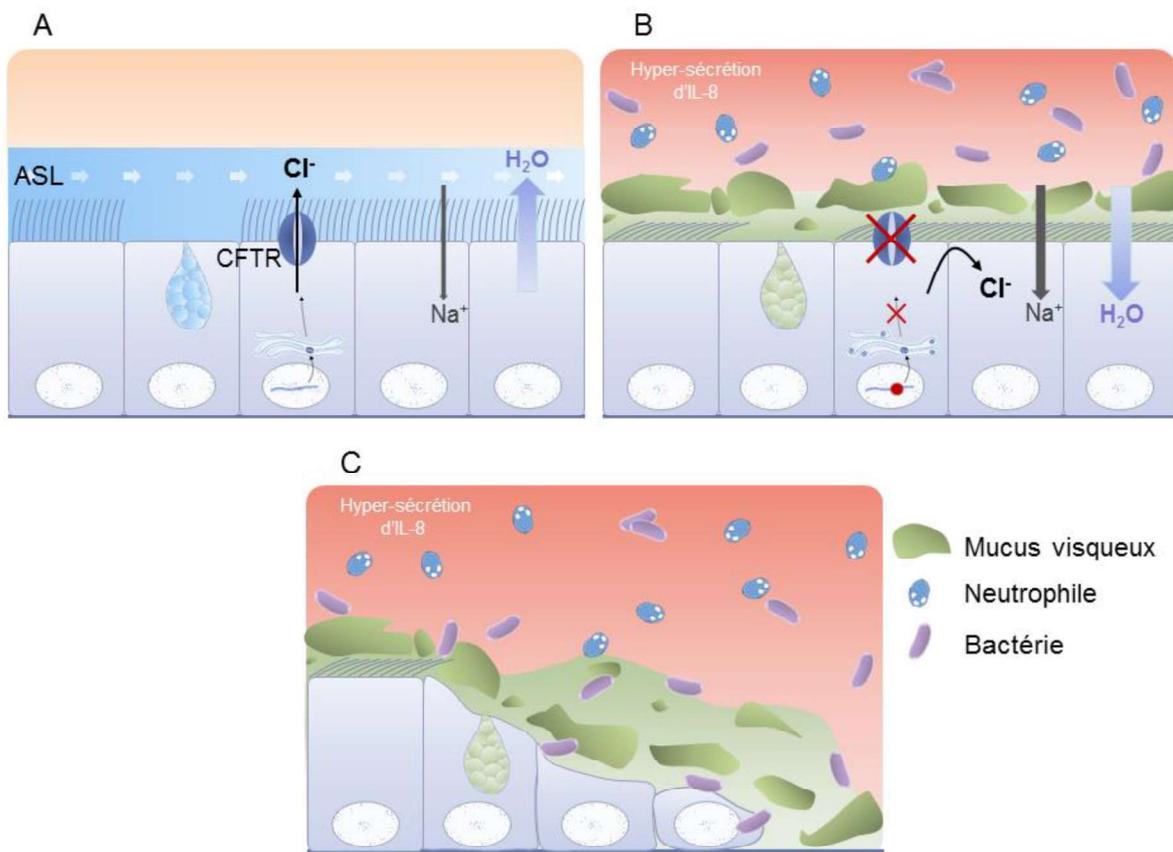
Au niveau de l'épithélium CF (Figure 16), l'absence et la dysfonction de la protéine CFTR entraînent des altérations de la composition ionique du liquide de surface des voies aériennes qui va se déshydrater et induire une diminution de la clairance mucociliaire (Boucher 2002). Cette altération de la clairance mucociliaire va augmenter la viscosité du mucus favorisant des cycles d'infection et d'inflammation chroniques chez les patients. Les jeunes patients atteints de mucoviscidose sont généralement infectés par *Haemophilus influenza*, puis *Staphylococcus aureus* et enfin *Pseudomonas aeruginosa*. L'inflammation présente dans les voies aériennes des patients est une inflammation précoce caractérisée notamment par un recrutement massif de polynucléaires neutrophiles et une sécrétion accrue d'interleukine 8 (IL-8), marqueur de l'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose (Tabary et al. 1998). Ces cycles d'infection et d'inflammation aboutissent à long terme à la dégradation de l'épithélium pulmonaire entraînant progressivement l'insuffisance respiratoire terminale des patients. En effet, les agressions répétées bactériennes, virales ou inflammatoires de l'épithélium pulmonaire des patients entraînent l'activation de mécanismes de réparation qui, dans le cas de la mucoviscidose, sont mal contrôlés et induisent l'apparition de zones de remaniement épithélial. Une fibrose sous-épithéliale se développe parallèlement à la desquamation et au remodelage de l'épithélium. Le remodelage du tissu pulmonaire chez les patients se traduit par un épaississement bronchique à l'origine de l'altération de leur fonction respiratoire.

Diverses observations ont été faites au niveau des zones remodelées. Ces zones peuvent comprendre :

- une métaplasie squameuse (Mithal and Emery 1976), l'épithélium est de type pavimenteux stratifié et constitué de cellules basales en contact avec la membrane

basale surmontées par des cellules polyédriques et enfin par une couche superficielle de cellules aplaties, ce type d'épithélium est absent de l'appareil respiratoire en conditions physiologiques,

- une hyperprolifération cellulaire (Leigh et al. 1995),
- une hyperplasie des cellules basales et des cellules à mucus (Voynow et al. 2005), et
- une augmentation de la hauteur de l'épithélium (Hajj et al. 2007).



**Figure 16 : Schéma comparant l'épithélium pulmonaire non CF (A) et CF (B et C).**  
**B :** la déficience de CFTR entraîne un déséquilibre ionique caractérisé par une diminution de la sortie d'ions Cl<sup>-</sup>, une augmentation de l'entrée d'ions Na<sup>+</sup> et une déshydratation du liquide de surface des voies aériennes menant à un épaissement du mucus. **C :** La diminution de la clairance mucociliaire et les cycles d'infection et d'inflammation chroniques aboutissent à long terme à la dégradation de l'épithélium pulmonaire d'après (Sonneville et al. 2015) (ASL : liquide de surface des voies aériennes).

Plusieurs facteurs ont été impliqués dans la réparation anormale de l'épithélium des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose. L'utilisation d'un modèle de xéno-greffes

de trachées de rats ensemencées avec des cellules épithéliales pulmonaires humaines dans des souris *nude* a permis de montrer que, dans un contexte non-infectieux, la réparation de l'épithélium CF est retardée (Hajj et al. 2007). Cette étude montre également que le retard de différenciation de l'épithélium est dû à l'allongement de la phase de prolifération et à la dérégulation des MMP-7 et 9, de l'inhibiteur de métalloprotéinases TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) et de l'IL-8.

## **1.7. Stratégies thérapeutiques**

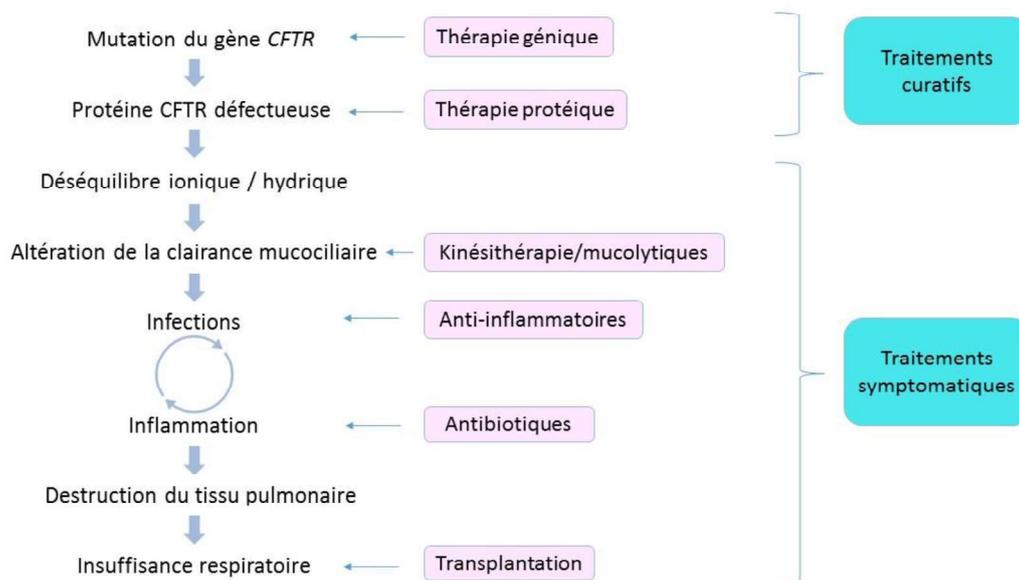
A ce jour, aucun traitement curatif n'existe pour lutter contre la mucoviscidose. Des progrès dans la prise en charge de la maladie ont tout de même été effectués puisqu'on constate une augmentation de l'espérance de vie des patients grâce aux traitements symptomatiques.

### **1.7.1. Prise en charge de l'atteinte pancréatique et digestive**

Afin de prendre en charge les carences alimentaires et la malabsorption des patients, une alimentation hyper énergétique et équilibrée, ainsi qu'une supplémentation en enzymes pancréatiques et vitamines sont apportées (Spielberg and Clancy 2016).

### **1.7.2. Prise en charge de l'atteinte pulmonaire**

Il existe deux grands groupes de traitements pour les patients atteints de mucoviscidose : les traitements curatifs et les traitements symptomatiques (Figure 17).



**Figure 17 : Stratégies thérapeutiques pour la prise en charge de l'atteinte respiratoire des patients atteints de mucoviscidose.**

Les traitements visant à améliorer l'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose sont les plus nombreux et variés. Ils peuvent être catégorisés en trois groupes (Spielberg and Clancy 2016) :

- traitements de la clairance mucociliaire,
- traitements anti-infectieux, et,
- traitements anti-inflammatoires (Figure 17).

### **a) Thérapies améliorant la clairance mucociliaire**

L'amélioration de la clairance mucociliaire implique à la fois des traitements mécaniques et des traitements pharmacologiques. Les traitements mécaniques correspondent à de la kinésithérapie respiratoire quotidienne ou à l'utilisation d'une veste de compression pulmonaire permettant l'évacuation du mucus et la diminution de sa viscosité.

Deux traitements pharmacologiques inhalés ont montré une amélioration de la clairance mucociliaire : l'utilisation de DNase recombinante humaine (rhDNase ou dornase alpha ou Pulmozyme®) par nébulisation et le sérum salé hypertonique. La rhDNase est un mucolytique, elle dégrade l'ADN présent en excès provenant de la dégradation de cellules

présentes sur le site de l'inflammation comme les neutrophiles. Il a été montré que la rhDNase améliorait la fonction pulmonaire et diminuait le nombre d'exacerbations de patients atteints de mucoviscidose (Mogayzel et al. 2013). Le sérum salé hypertonique va, lui, augmenter l'hydratation des voies aériennes et donc permettre d'augmenter la clairance mucociliaire.

### **b) Thérapies anti-infectieuses**

Lors d'infections, un examen cyto bactériologique des crachats (ECBC) ainsi qu'un antibiogramme permettant d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques sont réalisés afin de proposer une antibiothérapie adéquate aux patients.

La prévalence de l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* augmente avec l'âge et devient le pathogène le plus fréquemment retrouvé dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose. La colonisation par *Pseudomonas* est associée à un déclin plus rapide de la fonction pulmonaire des patients (Emerson et al. 2002). Des stratégies d'éradication de la bactérie ont émergé les dernières années pour retarder le développement de l'infection chronique. La tobramycine inhalée est fortement recommandée pour gérer l'infection chronique à *Pseudomonas*. Différentes formulations de tobramycine ont été développées : des solutions de tobramycine concentrées pour nébulisation (Bekthis, T100, et Vantobra) et une formulation en poudre sèche (TOBI). La colistine a récemment été étudiée et approuvée en Europe puisqu'elle présente des effets similaires à la tobramycine (Schuster et al. 2013).

### **c) Thérapies anti-inflammatoires**

Dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose, l'inflammation est précoce et accentuée par les infections à répétition, elle est caractérisée notamment par l'infiltration massive de neutrophiles. Les traitements anti-inflammatoires comme les corticoïdes inhalés diminuent le recrutement des neutrophiles et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Un composé de la famille des macrolides, l'azythromycine présente également une action anti-inflammatoire et induit une amélioration de la fonction respiratoire des patients après six mois de traitement. Cependant, un essai multicentrique reste nécessaire pour conclure sur les effets de son administration à long terme (Southern et al. 2012).

#### d) La transplantation pulmonaire

La transplantation pulmonaire représente le dernier recours pour les patients présentant une insuffisance respiratoire sévère engageant le pronostic vital. La transplantation permet d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients atteints de mucoviscidose mais il ne s'agit pas d'un traitement curatif.

### 1.7.3. Nouvelles stratégies thérapeutiques

Les différentes avancées technologiques et scientifiques des dernières années permettent d'apporter de nouvelles thérapies visant à corriger CFTR à travers la thérapie génique ou protéique.

#### a) Thérapie génique

La thérapie génique repose sur la stratégie de remplacement du gène *CFTR* défectueux par un gène sain. La mucoviscidose étant une maladie monogénique, les chercheurs ont fondé de nouveaux espoirs de guérison sur cette thérapie. Celle-ci pourrait être appliquée à tous les patients puisqu'elle est indépendante du type de mutations de *CFTR*. Plusieurs challenges existent, notamment la délivrance efficace du transgène et la réponse inflammatoire de l'hôte. Deux types de vecteurs pour la thérapie génique existent : les vecteurs à virus (rétrovirus, adénovirus, AAV (*adeno-associated virus*)) et les vecteurs synthétiques. Les vecteurs synthétiques sont des molécules artificielles capables de lier du matériel génétique et présentent l'avantage d'être moins immunogènes que les vecteurs viraux. Cette approche *via* les vecteurs synthétiques est utilisée dans une étude clinique par le Consortium britannique de thérapie génique pour la mucoviscidose. Les patients ont reçu le plasmide d'ADNc CFTR couplé à un liposome cationique ou un placebo une fois par mois pendant 12 mois par nébulisation. Les premiers résultats de la phase II ont été récemment publiés et montrent une amélioration modeste du VEMS (1,5%) des patients ayant reçu le vecteur non-viral contenant l'ADNc CFTR, indiquant une stabilisation de la fonction pulmonaire de ces patients (Alton et al. 2015).

## b) Thérapie protéique

La thérapie protéique est une approche pharmacologique faisant intervenir des correcteurs ou des potentiateurs de CFTR en fonction du type de mutation de *CFTR*.

### *Thérapies visant à passer outre les codons stop prématurés*

Les mutations de classe I sont caractérisées par la présence d'un codon stop prématuré et aboutissent à la production d'une protéique tronquée et non fonctionnelle. Des molécules permettent de reprendre la lecture du gène au-delà du codon stop prématuré, on parle de phénomène de translecture. Les premiers travaux menés sur des translecteurs chez les patients atteints de mucoviscidose ont été réalisés avec des antibiotiques de la classe des aminoglycosides comme la gentamicine. Les essais thérapeutiques réalisés avec la gentamicine ont montré des effets bénéfiques cliniques chez les patients, cependant, l'administration de gentamicine au long court entraîne des effets secondaires néfastes (néphrotoxicité et ototoxicité) (Wilschanski et al. 2003). Une molécule apparentée à la gentamicine non-aminoglycoside a donc été développée par la société PTC Therapeutics® : l'ataluren ou PTC124. Des essais cliniques de phase II ayant testé l'ataluren versus placebo ont montré une amélioration du transport de chlore au niveau de l'épithélium nasal des patients sous ataluren (Kerem et al. 2008, Sermet-Gaudelus et al. 2010). Une étude clinique de phase III a donc été lancée incluant 238 patients porteurs d'une mutation de classe I, les résultats de cette étude clinique n'ont pas montré de différence significative du VEMS ou du nombre d'exacerbations pulmonaires entre les groupes traités par l'ataluren et placebo. Cependant, une amélioration du VEMS ainsi qu'une diminution du nombre d'exacerbations a été observée dans un sous-groupe de patients n'utilisant pas d'aminosides inhalés (Kerem et al. 2014). Une nouvelle étude clinique de phase III excluant spécifiquement les patients utilisant des aminosides inhalés est actuellement en cours.

### *Potentiateurs*

Le Kalydéco® (Ivacaftor ou VX-770) développé par la société Vertex Pharmaceuticals (Van Goor et al. 2009) est le premier potentiateur de la conductance Cl<sup>-</sup> de CFTR à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché par la commission européenne. Ce médicament était initialement destiné aux patients âgés de plus de six ans porteurs de la mutation G551D

(mutation présente chez environ 1,6 % des patients français). Le Kalydéco® induit des améliorations de la fonction pulmonaire dès deux semaines de traitement, maintenues pendant les 48 semaines des deux essais cliniques de phase III réalisés. On note également chez les patients de nombreuses améliorations sur le nombre d'exacerbations, les symptômes respiratoires, le poids et la concentration de Cl<sup>-</sup> dans la sueur (Davies et al. 2013, Barry et al. 2014). Compte tenu de l'efficacité du Kalydéco® chez les patients porteurs de la mutation G551D, la société Vertex Pharmaceuticals a testé ce traitement sur des patients porteurs d'autres mutations de classe III. L'efficacité du traitement ayant été démontrée, le Kalydéco® a obtenu une extension d'autorisation de mise sur le marché pour huit mutations supplémentaires : G1224E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N et S549R (De Boeck et al. 2014).

L'effet du VX-770 a été étudié lors d'un essai clinique sur des patients homozygotes pour la mutation F508del. Les résultats ont montré une absence d'effet clinique positif suggérant que l'utilisation d'un potentiateur de CFTR seul n'est pas une approche thérapeutique efficace pour ces patients (Flume et al. 2012).

### *Correcteurs*

Pour les patients porteurs d'une mutation de classe II, la protéine est rapidement dégradée au sein de la cellule. Des correcteurs chimiques et pharmacologiques qui empêcheraient la dégradation de la protéine mutée et qui permettraient un réadressage de la protéine à la membrane sont en cours d'étude. Les correcteurs chimiques sont définis comme de petites molécules non spécifiques qui stabilisent les protéines cellulaires en agissant sur des protéines chaperonnes ou sur le protéasome. Les correcteurs pharmacologiques agissent directement sur la protéine CFTR mutée (Tildy and Rogers 2015). La génistéine, le curcumin et le miglustat font partie des correcteurs chimiques de CFTR. Le miglustat est un inhibiteur de l' $\alpha$ -1,2-glycosidase du RE, l'inhibition de cette enzyme conduit à une protéine CFTR glycosylée qui n'est pas reconnue par les protéines chaperonnes telles que la calnexine, la protéine peut donc sortir du RE. L'efficacité du miglustat a été démontré *in vitro* et *in vivo* mais un essai clinique de phase II n'a pas montré de bénéfice significatif pour les patients CF (Tildy and Rogers 2015)..

La société Vertex Pharmaceuticals est leader sur le marché pour le développement des correcteurs pharmacologiques de CFTR. Vertex a, en effet, développé le VX-809 (lumacaftor) et des études *in vitro* ont montré que le VX-809 permettait d'augmenter la maturation et l'expression à la membrane de la protéine CFTR en stabilisant le domaine TMD1, les courants  $\text{Cl}^-$  dépendants de CFTR et la hauteur du liquide de surface des voies aériennes (Van Goor et al. 2011). Deux études cliniques de phase III incluant 1108 patients de plus de 12 ans homozygotes pour la mutation F508del utilisant l'association VX-770 + VX-809 (Orkambi) *versus* placebo ont été réalisées et ont montré une augmentation modeste du VEMS d'environ 5% et une diminution du nombre d'exacerbations pulmonaires et d'hospitalisations des patients sous Orkambi (Wainwright et al. 2015) permettant à l'Orkambi d'obtenir une autorisation de mise sur le marché. L'association de ces deux molécules permet de faire réexprimer la protéine CFTR à la membrane et de stimuler son activité.

Un autre correcteur de CFTR, le VX-661 est également en cours d'essai clinique pour les patients homozygotes pour la mutation F508del.

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif pour les patients atteints de mucoviscidose, il est donc nécessaire de proposer de nouvelles thérapies. Une des stratégies thérapeutiques proposées dans la littérature serait de stimuler une voie alternative d'ions  $\text{Cl}^-$  comme la voie des CaCC.

## 2. Anoctamine 1 (ANO1)

Les canaux chlorures sont des protéines qui facilitent la diffusion des ions  $\text{Cl}^-$  dans le sens du gradient électrochimique à travers les membranes biologiques. Ces canaux peuvent aussi faciliter la diffusion d'autres anions mais ils sont communément appelés canaux chlorures car l'ion  $\text{Cl}^-$  est l'anion le plus abondant dans l'organisme. Les canaux  $\text{Cl}^-$  peuvent être regroupés en cinq classes :

- le canal  $\text{Cl}^-$  CFTR activé par l'AMPc,
- les canaux  $\text{Cl}^-$  dépendants du voltage (*voltage-gated chloride channels* : ClC),
- les canaux  $\text{Cl}^-$  dépendants du volume (*volume-regulated anion channels* : VRAC),
- les récepteurs-canaux, canaux  $\text{Cl}^-$  activés par des ligands tels que le GABA ou la glycine (*ligand-gated anion channels* : LGAC), et enfin,
- les canaux  $\text{Cl}^-$  activés par le calcium cytosolique (*calcium-activated chloride channels* : CaCC) (Jentsch et al. 2002).

Les protéines responsables des efflux chlorures des quatre premières classes de canaux  $\text{Cl}^-$  ont été identifiées et leurs structures, fonctions et implications dans des pathologies ont été relativement bien étudiées (Nilius and Droogmans 2003). Bien que l'existence de courants  $\text{Cl}^-$  activés par le calcium cytosolique ait été établie dès les années 1980, les protéines responsables de ces courants sont restées inconnues pendant de nombreuses années.

### 2.1. Découverte de l'identité moléculaire des CaCC

#### 2.1.1. La conductance chlorure activée par le calcium

Les courants CaCC ont été décrits pour la première fois en 1981 dans des œufs de grenouille *Rana pipiens* (Cross 1981) puis dans des ovocytes de Xénope (*Xenopus laevis*) (Miledi 1982). Aujourd'hui, les CaCC ont été identifiés dans de nombreux types cellulaires (neurones, cellules épithéliales des voies aériennes, cellules pancréatiques...). Les CaCC contrôlent de multiples fonctions physiologiques. Ils ont un rôle dans la transduction olfactive, gustative et

visuelle, ils régulent l'excitabilité neuronale (Frings et al. 2000), la contraction des cellules musculaires lisses (Leblanc et al. 2005) et la production de fluides par les cellules épithéliales sécrétrices de différents organes dont celles des voies aériennes (Kidd and Thorn 2000).

Les CaCC ont des caractéristiques biophysiques propres qui permettent de les différencier des autres conductances chlorures :

- ils sont activés par le calcium cytosolique, leur seuil d'activation se situe entre 0,2 et 5  $\mu\text{M}$  de calcium intracellulaire libre (Hartzell et al. 2005).
- ils présentent une rectification sortante de leur relation courant/voltage à des concentrations faibles de  $\text{Ca}^{2+}$  qui devient linéaire en présence de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nilius et al. 1997).
- ils sont relativement peu sélectifs et se caractérisent par la séquence de perméabilité anionique suivante :  $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$  (Qu and Hartzell 2000).
- ils sont inhibés par le DIDS (*4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid*) et l'acide niflumique (NFA pour *niflumic acid*) et sont insensibles au DTT (dithiothréitol) (Eggermont 2004).

### 2.1.2. Les candidats aux CaCC

Plusieurs études ont proposé les canaux CLCA, CIC-3 et bestrophines comme candidats moléculaires aux CaCC.

#### a) CLCA

Un des premiers candidats aux CaCC a été purifié à partir de trachées bovines et nommé CLCA pour « *chloride channel calcium-activated* » (Cunningham et al. 1995). Quatre isoformes de CLCA ont été identifiées chez l'Homme (CLCA1 à 4). Les CLCA ont été proposés comme candidats aux CaCC car ils présentent des caractéristiques communes aux CaCC endogènes : ils sont dépendants du calcium, leur séquence de perméabilité anionique est identique à celle des CaCC endogènes, et ils sont inhibés par le DIDS. Cependant, il apparaît désormais que les CLCA ne sont pas des CaCC : en effet, Papassotiriou *et al.* ont montré que les courants CLCA sont bloqués par le DTT et que certains types cellulaires présentant une

activité CaCC endogène n'expriment pas de protéines CLCA (Papassotiriou et al. 2001). Il a de plus été montré que le courant CLCA n'est pas bloqué par l'addition d'acide niflumique qui inhibe normalement les courants CaCC (Cunningham et al. 1995).

### b) CIC-3

Les canaux CIC-3 appartiennent à la famille des canaux Cl<sup>-</sup> sensibles au voltage, ils ont été clonés pour la première fois à partir de l'organe électrique de la raie *Torpedo marmorata* puis identifiés chez les procaryotes et eucaryotes. Le CIC-3 a été initialement proposé comme candidat moléculaire aux CaCC. Des expériences sur des souris invalidées pour *CLCN3* (*CLCN3*<sup>-/-</sup>) ont montré la présence d'une conductance chlorure activée par le calcium similaire à celle observée chez des souris sauvages suggérant que les canaux CIC-3 ne sont pas de bons candidats moléculaires des CaCC (Arreola et al. 2002).

### c) Bestrophines

En 1998, le gène *BEST* codant pour les bestrophines est identifié comme responsable de la maladie de Best aussi appelée dystrophie maculaire héréditaire qui induit une vision trouble, une perte de l'acuité visuelle ou une déformation de la perception des images (Petrukhin et al. 1998). Il existe 4 sous-types de bestrophines identifiées chez l'homme (bestrophines 1 à 4) (Qu et al. 2003). Sun *et al.* ont montré que l'expression des bestrophines induit l'apparition de courants Cl<sup>-</sup> sensibles aux ions calciques faisant des bestrophines des candidats moléculaires aux CaCC (Sun et al. 2002). Cependant, les souris invalidées pour la bestrophine 2 ne montrent pas d'altération de la conductance CaCC dans différents types cellulaires (Pifferi et al. 2009). De même, les souris *knock-out* (KO) pour la bestrophine 1 ne présentent pas de diminution de la conductance CaCC (Barro-Soria et al. 2008). De plus, les bestrophines ne présentent pas de cinétique dépendante du voltage ni de rectification sortante, et ne sont pas inhibés par les inhibiteurs pharmacologiques des CaCC (Kunzelmann 2015). Il semble donc que les bestrophines ne soient pas des CaCC, mais peuvent être des régulateurs d'autres canaux ioniques comme les canaux calciques voltage-dépendants (Yu et al. 2008).

### 2.1.3. Identification d'ANO1 comme CaCC

En 2008, trois équipes distinctes identifient le canal ANO1 (Anoctamine 1) aussi appelé TMEM16A (*transmembrane protein 16A*) comme CaCC en utilisant des approches expérimentales différentes (Caputo et al. 2008, Schroeder et al. 2008, Yang et al. 2008).

Yang *et al.* ont identifié ANO1 en utilisant une approche bioinformatique. Ils ont cherché dans des bases de données des gènes codant pour des protéines inconnues avec de multiples segments transmembranaires. La protéine ANO1 semblait être un candidat intéressant, ils ont donc effectué différentes expériences pour caractériser cette dernière et ont pu montrer que l'expression d'ANO1 dans des systèmes d'expression hétérologues générait des courants chlorures activés par la mobilisation de calcium intracellulaire. La co-expression d'ANO1 avec des récepteurs purinergiques suivie d'une stimulation avec l'agoniste du récepteur correspondant résulte en l'apparition de larges courants CaCC qui répondent aux inhibiteurs pharmacologiques des CaCC. Les auteurs ont pu montrer qu'ANO1 présentait l'ensemble des caractéristiques biophysiques des CaCC (Yang et al. 2008).

Schroeder *et al.* ont utilisé une approche par clonage après avoir réalisé que les ovocytes de la salamandre Axolotl (*Ambystoma mexicanum*), à la différence de ceux de Xénope, n'ont pas d'activité endogène de CaCC. De façon intéressante, cette différence est due à une raison physiologique. Les courants CaCC sont utilisés dans les ovocytes de Xénope pour générer le potentiel de fertilisation qui prévient la polyspermie, alors que ces courants ne sont pas nécessaires dans les ovocytes d'Axolotl physiologiquement polyspermiqes. Les auteurs ont remarqué que l'injection d'ovocytes d'Axolotl avec la fraction de 5-7 kb d'ARN polyA extraite de Xénope génère de puissants courants CaCC. Pour identifier ANO1, Schroeder *et al.* ont donc généré une banque d'ADNc et ont montré après des évaluations fonctionnelles que seul un clone contenant la séquence codante d'ANO1 induisait l'apparition de courants CaCC présentant toutes les caractéristiques biophysiques des courants CaCC endogènes (relation courant-voltage, sélectivité anionique, sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  et profil pharmacologique) dans les ovocytes d'Axolotl. Des courants CaCC ont aussi été observés lorsqu'ANO1 était exprimé dans la lignée cellulaire HEK-293, une lignée cellulaire

dépourvue d'activité CaCC endogène. Enfin, cette étude montre que l'expression d'ANO1 est détectée dans les tissus connus pour avoir une activité CaCC (Schroeder et al. 2008).

Caputo *et al.* ont identifié ANO1 en utilisant une approche génomique fonctionnelle. Ces auteurs ont précédemment montré que les cellules épithéliales bronchiques humaines répondent à des traitements prolongés (24h) avec de l'interleukine-4 (IL-4) ou de l'interleukine-13 (IL-13) en augmentant l'activité des CaCC (Galiotta et al. 2002). Ils ont posé l'hypothèse selon laquelle cet effet pouvait être dû à une augmentation des niveaux d'ARNm du gène codant pour les CaCC. Par conséquent, les auteurs ont utilisé des puces à ADN *microarrays* pour identifier des protéines dont l'expression en ARNm était surexprimée suite à un traitement avec de l'IL-4 et de fonction inconnue. Plusieurs gènes candidats ont été identifiés et ensuite étudiés grâce à l'utilisation de siRNA (*small interfering RNA*). ANO1 était le seul gène dont l'inhibition résultait en une diminution significative des courants CaCC de 60 à 70% dans différents modèles cellulaires qui présentent une activité CaCC dont les cellules épithéliales bronchiques CFBE410<sup>-</sup>, les cellules pancréatiques CFPAC-1 et des cultures primaires humaines de cellules épithéliales bronchiques. Les auteurs ont ensuite caractérisé les efflux Cl<sup>-</sup> liés à ANO1 et effectué des expériences de mutagenèse dirigée sur des acides aminés conservés qui leur ont permis de conclure qu'ANO1 est un canal Cl<sup>-</sup> activé par le Ca<sup>2+</sup> (Caputo et al. 2008).

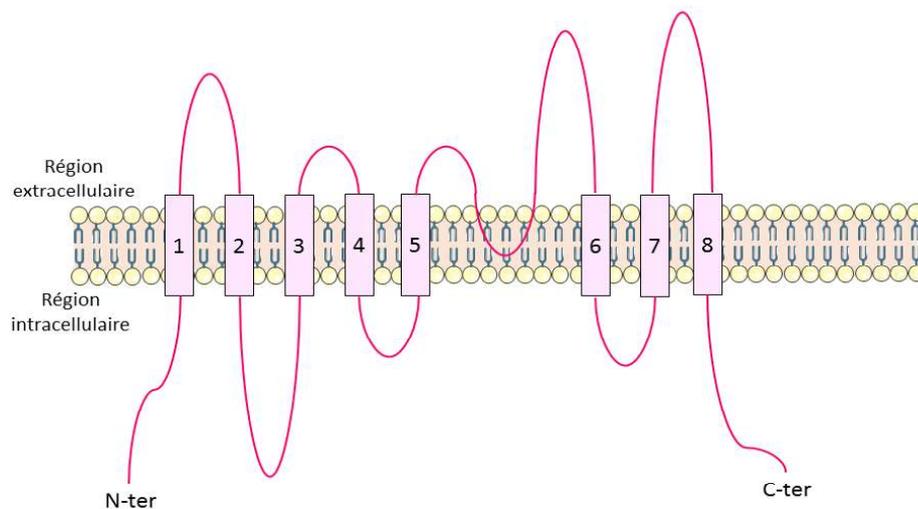
Dans toutes les cellules dépourvues d'activité CaCC endogène, telles que les HEK-293 ou les cellules FRT, la transfection d'ANO1 est suffisante pour générer des courants CaCC avec des propriétés biophysiques similaires à celles des CaCC natifs (Caputo et al. 2008, Schroeder et al. 2008, Yang et al. 2008). De plus, des mutagenèses site-spécifiques de résidus conservés dans la séquence d'ANO1 mènent à des changements spécifiques des propriétés des CaCC comme la sélectivité ionique ou la dépendance au voltage (Caputo et al. 2008, Yang et al. 2008). Il a également été montré que l'activité CaCC est significativement diminuée dans l'épithélium trachéal de souris KO pour ANO1 comparée à celle de souris sauvages (Rock et al. 2009). Finalement, dans une étude récente, la protéine ANO1 a été purifiée et reconstituée dans des protéoliposomes afin de tester sa fonction *in vitro*. Les auteurs ont pu montrer que la protéine ANO1 humaine purifiée seule possédait toutes les propriétés biophysiques et pharmacologiques des CaCC natifs démontrant qu'ANO1 est une protéine

suffisante pour former des courants CaCC fonctionnels (Terashima et al. 2013). ANO1 semble donc être le meilleur candidat aux CaCC.

## 2.2. Gène et protéine ANO1

### 2.2.1. La famille des anoctamines

ANO1 appartient à la famille des anoctamines (ANO pour canal anionique et OCTA pour huit domaines transmembranaires). Les anoctamines comptent 10 protéines (ANO1-10 ou TMEM16A-K, excluant la lettre I) et ont une taille comprise entre 800 et 1000 acides aminés. Les anoctamines ont une structure similaire avec huit domaines transmembranaires et les extrémités N-ter et C-ter situées dans le cytoplasme (Figure 18). La région comprise entre les domaines transmembranaires 5 et 6 correspond à une boucle qui traverse partiellement la membrane et forme le pore du canal.



**Figure 18 : Topologie prédite des anoctamines.**  
D'après (Pedemonte and Galiotta 2014).

La famille des anoctamines est relativement ancienne et conservée à travers l'évolution. Il existe plusieurs homologues détectés dans des espèces animales autres que Vertébrés, par exemple, il existe des protéines retrouvées chez les insectes partageant plus de 40%

d'identité avec la protéine ANO1 humaine (*Drosophila genus, Aedes aegypti, Tribolium castaneum*) (Pedemonte and Galiotta 2014). Chez les mammifères, les gènes codants pour les protéines ANO1 à 10 partagent une homologie de séquence importante, particulièrement dans la région formant le pore d'ANO1 incluant les segments transmembranaires 5 et 6. Une forte conservation de séquence est également présente dans la région C-ter et a été nommé DUF590 (*domain of unknown function 590*) dans un premier temps puis *Anoctamin domain* (Pedemonte and Galiotta 2014).

L'homologie de séquence des différentes anoctamines peut laisser penser qu'elles ont des fonctions semblables, or, à l'heure actuelle, les anoctamines peuvent être séparées en 2 groupes : ANO1 et ANO2 d'un côté et les autres anoctamines d'un autre. ANO1 et ANO2 ont une grande similarité et il a été montré qu'ANO2 possédait une activité CaCC au niveau des neurones sensoriels olfactifs murins et des photorécepteurs terminaux du système visuel (Stephan et al. 2009, Stohr et al. 2009). Cependant, les canaux ANO2 ont des caractéristiques biophysiques différentes d'ANO1 et l'expression d'ANO2 est limitée à l'épithélium voméronasal (Rock et al. 2009, Dibattista et al. 2012). Concernant les autres anoctamines, de nombreux tests ont été réalisés et rapportent des résultats contradictoires. L'analyse de la conductance au chlore activée par le calcium après la surexpression de chacune des 10 anoctamines dans différents types cellulaires ne permet pas de conclure à l'activité CaCC des anoctamines 3 à 10 (Schreiber et al. 2010). De façon notable, ANO6 a été classé comme une scramblase c'est-à-dire une protéine permettant la distribution asymétrique des phospholipides à la surface interne et externe des cellules (Suzuki et al. 2010).

Par ailleurs, plusieurs anoctamines ont été impliquées dans des pathologies suggérant qu'elles possèdent des fonctions importantes (Pedemonte and Galiotta 2014). L'anoctamine 5 a été la première à être associée à une maladie génétique, en effet, il a été montré que des mutations dans le gène *ANO5* sont associées à plusieurs formes de dystrophies musculaires (Bolduc et al. 2010, Penttila et al. 2012, Little et al. 2013). Des mutations du gène *ANO3* sont à l'origine de certains cas de dystonie crânio-cervicale à transmission autosomique dominante (Charlesworth et al. 2012). Des mutations du gène *ANO6* ont été associées au syndrome de Scott, maladie hémorragique rare (Suzuki et al. 2010). Enfin, deux études ont

mis en évidence la présence de mutations du gène *ANO10* chez des patients atteints d'ataxie cérébelleuse autosomique récessive (Vermeer et al. 2010, Chamova et al. 2012).

Par la suite, je présenterai le canal ANO1, seul CaCC dont l'identité moléculaire a été clairement établie dans les voies aériennes, et qui fait l'objet de ce travail.

### 2.2.2. Gène ANO1

Le gène *ANO1* (Figure 19), composé d'environ 110 kb, est localisé sur le bras long du chromosome 11 humain en position 11q13.3 entre les gènes *FGF3* (*Fibroblast Growth Factor*) et *FADD* (*Fas-Associated protein with Death Domain*).

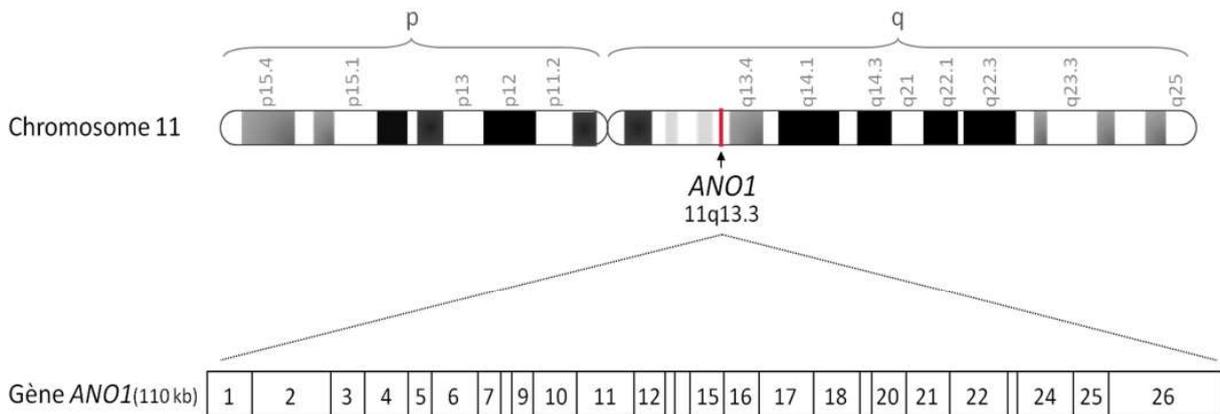


Figure 19 : Le gène ANO1.

Localisation du gène *ANO1* sur le chromosome 11 (haut) et enchaînement des exons du gène *ANO1* (bas) d'après (Ferrera et al. 2009).

Ce gène est à l'origine de la synthèse d'un ARNm de 4,79 kb qui va ensuite être traduit en protéine ANO1.

### 2.2.3. Protéine ANO1

La protéine ANO1, produit du gène *ANO1*, était précédemment appelée TMEM16A, ORAOV2 (*oral cancer overexpressed 2*), DOG1 (*discovered on gastrointestinal stromal tumor 1*) ou encore TAOS2 (*tumor amplified and overexpressed sequence 2*). ANO1 est composée de 986 acides aminés qui forment une protéine d'un poids moléculaire total de 114 kDa.

### a) Structure de la protéine ANO1 et sites de régulation

La protéine ANO1 possède huit domaines transmembranaires reliés par des boucles intra- ou extracellulaires dont une boucle p (fixant le phosphate) entre les domaines transmembranaires 5 et 6. Les extrémités N-ter et C-ter de la protéine sont localisées dans le compartiment intracellulaire.

Des expériences de mutagenèse dirigée ciblant quatre acides aminés chargés situés entre les domaines transmembranaires 5 et 6 ont montré une variation de la sélectivité ionique du canal suggérant que cette région formait le pore du canal ANO1 (Yang et al. 2008). Dans la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire, une équipe a montré que deux acides glutamiques (E702 et E705) sont capables de lier le calcium intracellulaire et d'ainsi médier l'activation du canal (Yu et al. 2012). Trois sites de liaison à la calmoduline ont été identifiés : RCBM sur l'extrémité N-ter (Vocke et al. 2013), CBM1 à l'extrémité N-ter et CBM2 localisé avant le 7<sup>ème</sup> domaine transmembranaire (Figure 20) (Jung et al. 2013). Le traitement avec une enzyme déglycosylante induit une diminution du poids moléculaire d'ANO1 après migration sur gel de polyacrylamide indiquant que cette protéine est glycosylée, d'autre part seule la protéine ANO1 mature glycosylée semble atteindre la membrane plasmique (Fallah et al. 2011). Plusieurs séquences consensus de glycosylation existent sur ANO1, la plupart sont situées sur la boucle extracellulaire reliant les domaines transmembranaires 7 et 8. Enfin, une petite région localisée à l'extrémité N-ter est importante pour la dimérisation d'ANO1 (Figure 20) (Pedemonte and Galiotta 2014).

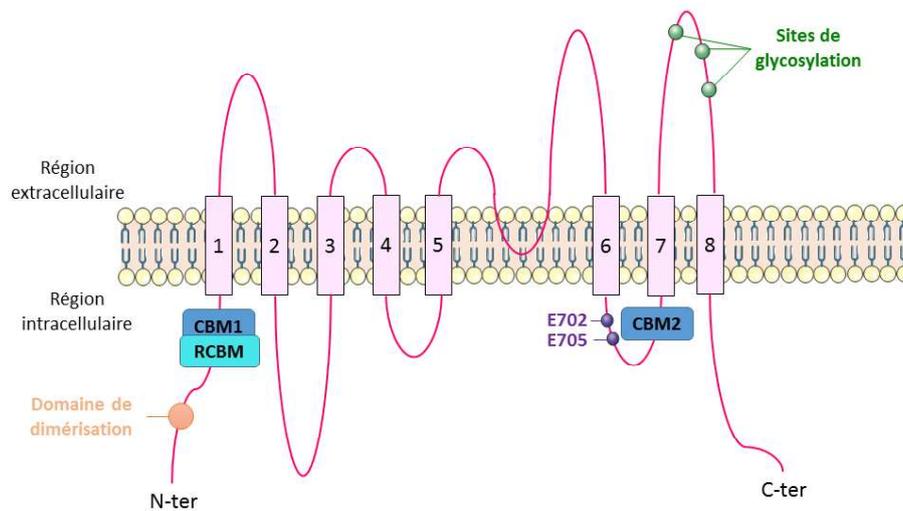


Figure 20 : Structure de la protéine ANO1 et localisation de ses sites de régulation. D'après (Pedemonte and Galletta 2014).

## b) Stœchiométrie d'ANO1

Certaines études indiquent que la protéine ANO1 est structurée comme un homodimère de manière spécifique. Sheridan et ses collaborateurs ont taggué la protéine ANO1 avec deux protéines fluorescentes, mCherry (rouge) et eGFP (vert). La co-expression d'ANO1 rouge et vert dans la même cellule démontre un niveau significatif de transfert d'énergie par résonance fluorescente (FRET) ce qui est indicatif d'une interaction physique proche. La technique de co-immunoprécipitation a également été utilisée par les auteurs pour montrer la formation d'un dimère. Les auteurs ont montré que les sous-unités d'ANO1 s'associent avant d'atteindre la membrane plasmique et que cette association n'est pas altérée par les changements de concentration calcique du cytosol, suggérant qu'il s'agit d'une interaction fixe et que la protéine ANO1 n'existerait à la membrane qu'à l'état de dimère. De plus, les auteurs ont montré que l'assemblage homodimérique d'ANO1 peut être séparé en monomères par traitement avec du SDS (sodium dodécyl sulfate) qui supprime les liaisons non covalentes, alors que le DTT (dithiothréitol) qui réduit les ponts disulfures n'a pas d'effet. Les monomères ANO1 semblent donc être associés par des liaisons non covalentes (Sheridan et al. 2011). Dans une étude plus récente, il a été montré que la formation de dimères d'ANO1 impliquait une région de la protéine localisée au site N-terminal. Les auteurs ont de plus identifié un petit segment de 19 acides aminés essentiels à la

dimérisation et à la fonction du canal en introduisant une mutation, A169P, prédite pour altérer la structure en hélice  $\alpha$  du domaine de dimérisation. La mutation abolit la dimérisation, le trafic de la protéine jusqu'à la membrane plasmique et l'activité du canal (Tien et al. 2013). De plus, de manière intéressante, ANO1 co-immunoprécipite avec ANO2 mais pas avec ANO6.

### c) Epissage alternatif d'ANO1

Plusieurs études ont fait état de l'existence d'un épissage alternatif d'ANO1 induisant la production de multiples isoformes de la protéine générées par l'inclusion ou le saut d'exons et/ou par l'utilisation d'un promoteur alternatif.

Il a été initialement reporté qu'ANO1 avait au moins 4 segments alternatifs nommés a, b, c et d. L'inclusion ou le saut des segments b (22 acides aminés), c (4 acides aminés) et d (26 acides aminés) est le résultat de l'épissage alternatif des exons 6b, 13 et 15 respectivement (Ferrera et al. 2009) (Figure 21). Le saut du segment a, qui correspond aux 116 premiers acides aminés de la protéine ANO1, est dépendant de l'activation d'un promoteur alternatif. Dans ce cas, la séquence correspondant aux 36 premiers codons est remplacée par une séquence où il manque un ATG (Sondo et al. 2014). Les auteurs ont cependant montré que des codons *start* non canoniques permettent la traduction d'une grande partie du segment a en absence du premier codon (Sondo et al. 2014).

L'épissage alternatif de ces exons induit toujours la synthèse de protéines possédant huit domaines transmembranaires mais de taille variant de 840 à 1004 acides aminés. Une autre étude a suggéré que l'épissage alternatif d'ANO1 était en réalité plus complexe car il impliquait l'inclusion ou l'exclusion d'autres exons (10, 13b, 14 et 18) dont l'expression est dépendante du tissu (O'Driscoll et al. 2011).

L'expression des différentes isoformes d'ANO1 est tissu-dépendante. Dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques, Caputo et ses collaborateurs indiquent que la forme exprimée de manière majoritaire est celle comportant les segments a, b et c (Caputo et al. 2008). Par ailleurs, il a été montré qu'une diminution significative de l'expression du segment a, résultant en une augmentation de transcrits codant pour des protéines ANO1

avec un N-ter réduit, était retrouvée dans l'estomac de patients diabétiques présentant une gastroparésie (Mazzone et al. 2011).

L'expression des différentes isoformes d'ANO1 a des conséquences fonctionnelles (Figure 21) sur l'activité du canal :

- l'inclusion de l'exon 6b résulte en une protéine ANO1 possédant 22 acides aminés complémentaires (segment b) dans la région précédant le 1<sup>er</sup> domaine transmembranaire. Il a été montré que cette inclusion était associée à des courants calciques moins sensibles au  $Ca^{2+}$  cytosolique (Ferrera et al. 2009). La liaison de la calmoduline à ce domaine module également l'activité du canal (Tian et al. 2011).
- le saut de l'exon 13 produit également des canaux avec des caractéristiques altérées. La délétion de 4 acides aminés correspondant au segment c entraîne une diminution de l'activation du canal à des potentiels de membrane positifs (Ferrera et al. 2009) et une diminution de la sensibilité aux ions  $Ca^{2+}$  (Xiao et al. 2011).
- l'épissage de l'exon 15 induit une augmentation de la cinétique d'activation et de désactivation du canal (Ferrera et al. 2009).
- l'absence combinée des segments a, b, c et d entraîne une protéine ANO1 présentant une sélectivité ionique et une voltage-dépendance anormales (Ferrera et al. 2011).

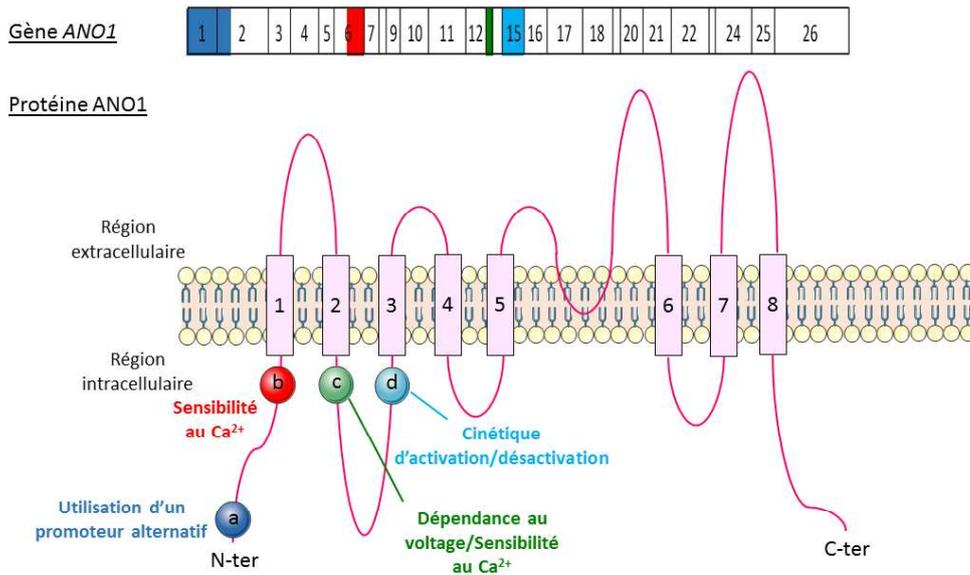


Figure 21 : Epissage alternatif du gène *ANO1* et ses conséquences fonctionnelles. Schémas du gène (haut), de la protéine (bas) *ANO1* et localisation des exons (1, 6, 13 et 15) et des segments (a, b, c et d) potentiellement épissés.

L'épissage alternatif d'*ANO1* implique donc des modifications fonctionnelles qui peuvent avoir des conséquences physiopathologiques importantes. D'autre part, l'expression tissu-spécifique d'isoformes d'*ANO1* pourrait expliquer l'observation de différents types de courants CaCC au sein de différents organes ou tissus.

#### d) Mécanisme d'activation d'*ANO1*

Avant l'identification d'*ANO1* comme CaCC, les mécanismes d'activation des CaCC étaient reliés à une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire via l'activation du récepteur  $\text{P2Y}_2$ , récepteur purinergique couplé à une protéine G (Figure 22) (Paradiso et al. 2001). Après stimulation des récepteurs  $\text{P2Y}_2$  par de l'ATP ou de l'UTP (uridine-5'-triphosphate), la phospholipase C (PLC) va être activée et cliver le  $\text{PIP}_2$  membranaire (phosphatidylinositol 4,5-diphosphate) en  $\text{IP}_3$  (inositol triphosphate) et DAG (diacyl glycérol). L'augmentation de la concentration intracellulaire en  $\text{IP}_3$ , second messenger qui se fixe sur son récepteur ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) à la surface du réticulum endoplasmique induit une libération des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme, ce qui conduit à l'activation des CaCC. Le calcium n'est cependant pas seul dans l'activation des CaCC, ces canaux sont aussi sous l'influence du potentiel de membrane. De manière plus précise, il a été montré

que la dépolarisation de la membrane augmente la sensibilité au calcium de ces canaux (Kuruma and Hartzell 2000).

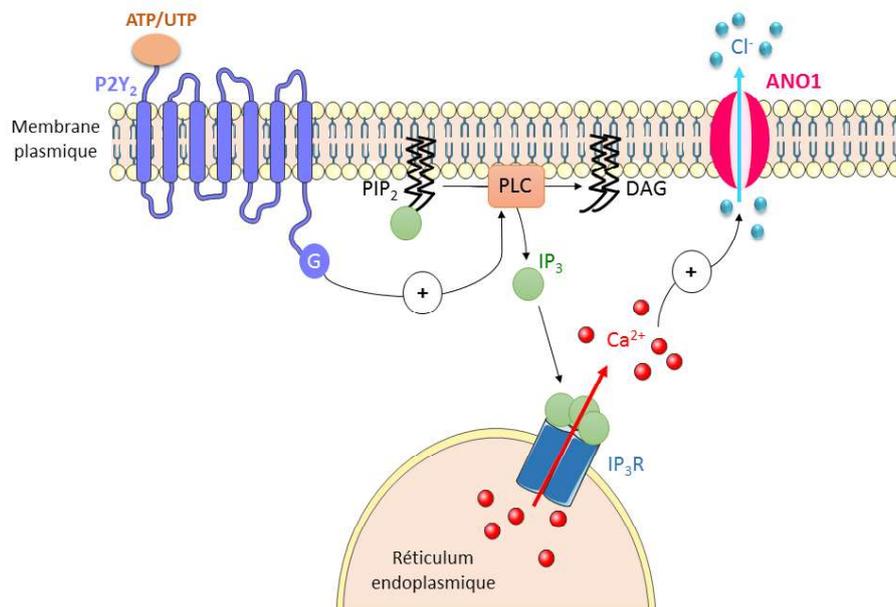


Figure 22 : Mécanisme d'activation des canaux CaCC.

Depuis l'identification d'ANO1, plusieurs équipes ont cherché à mettre en évidence son mécanisme d'activation. Les études initiales ont montré qu'ANO1 était activé par une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique mais les mécanismes par lesquels le  $\text{Ca}^{2+}$  induisait une activation d'ANO1 n'étaient pas connus. Une première étude a montré que l'expression simultanée d'ANO1 et du récepteur P2Y<sub>2</sub> dans des cellules HEK-293 induisait l'apparition de courants en réponse à une stimulation avec de l'ATP alors qu'aucun courant significatif n'était observé en conditions contrôles (Yang et al. 2008). Ces résultats montrent que l'activation d'ANO1 semble passer par l'activation de la voie purinergique comme décrit pour les CaCC endogènes (Figure 22). Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires pour vérifier chaque étape de la voie de signalisation. Aucun site de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  ou à la calmoduline (protéine ubiquitaire capable de s'associer aux ions calciques) n'était identifié dans la structure primaire d'ANO1, certaines études ont donc posé l'hypothèse que de nombreuses régions chargées négativement en acides aminés pourraient être des sites de liaison potentiels aux ions calciques. Il existe en particulier un cluster de 5 acides glutamiques dans la première boucle intracellulaire qui est fortement conservé à

travers l'évolution, ce cluster semblait être une poche de liaison des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Or Xiao *et al.* ont montré que la délétion de ce cluster abolissait la dépendance au voltage d'ANO1 sans altérer sa sensibilité au calcium. Par conséquent, cette région semble avoir un rôle allostérique dans la modulation de la sensibilité au calcium et non un rôle direct dans la liaison des ions calciques (Xiao *et al.* 2011). D'autres régions chargées négativement pourraient être directement impliquées. Récemment, un site de liaison direct au calcium a été identifié dans la séquence d'ANO1. Les auteurs ont émis l'hypothèse que deux acides glutamiques (E702 et E705) très conservés étaient impliqués dans l'interaction calcique, ils ont donc muté ces deux résidus en glutamine et ont pu observer un changement de la sensibilité au calcium du canal ANO1 supportant le rôle des acides aminés E702 et E705 dans la liaison directe au calcium pour l'ouverture du canal ANO1 (Yu *et al.* 2012) (Figure 20). Il est important de noter que d'autres sites de liaison au calcium peuvent exister et il est également possible que des sites de liaison soient créés à l'interface entre les sous-unités d'ANO1 pendant la formation du dimère.

La calmoduline pourrait être un autre facteur contribuant à la calcium-dépendance d'ANO1. L'inhibition de la calmoduline dans des cellules HEK-293 surexprimant ANO1 supprime en grande partie l'activation d'ANO1 par l'ATP ou la ionomycine, ionophore qui induit un relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme des cellules. Des expériences supplémentaires ont permis de montrer que la calmoduline co-immunoprécipite avec ANO1 (Tian *et al.* 2011). Une autre équipe a identifié un site de liaison directe pour la liaison de la calmoduline nommé RCBM (pour *regulatory calmodulin-binding motif*) localisé dans la région N-ter. Le domaine RCBM est présent dans ANO1 et ANO2 mais est moins conservé dans les autres anoctamines (Vocke *et al.* 2013). Jung *et al.* ont également montré qu'ANO1 était régulé par le complexe calcium-calmoduline. Les auteurs ont identifié deux sites de liaison pour la calmoduline : CBM1 (qui chevauche partiellement le domaine RCBM identifié par Vocke *et al.*) et CBM2 localisé avant le 7<sup>ème</sup> domaine transmembranaire (Figure 20) (Jung *et al.* 2013).

Il est important de noter que le calcium peut également avoir une activité inhibitrice sur ANO1. De hautes concentrations calciques peuvent, en effet, mener à une inhibition du canal par un mécanisme inconnu qui pourrait impliquer la phosphorylation par la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline kinase II (CaMKII) (Tian *et al.* 2012).

Enfin, il a été montré que le canal ANO1 était également régulé par la température, et plus particulièrement activé par des températures supérieures à 44°C (Cho et al. 2012).

#### **2.2.4. Localisation et expression d'ANO1**

La conductance chlorure activée par le calcium est présente dans presque tous les types cellulaires (Kunzelmann 2015). Le canal ANO1 est localisé à la membrane plasmique des cellules dans lesquelles il est exprimé (Tian et al. 2011, Duran et al. 2012, Ruffin et al. 2013).

ANO1 est présent dans les épithélia sécréteurs, et notamment dans l'épithélium des voies aériennes. ANO1 est exprimé au niveau de l'épithélium trachéal, du muscle lisse de la trachée et des cellules épithéliales bronchiolaire chez la souris (Rock et al. 2008, Yang et al. 2008). Chez l'homme, ANO1 est présent tout le long de l'appareil respiratoire, des bronches larges aux alvéoles en passant par les petites bronches et les bronchioles (Kunzelmann et al. 2012, Tian et al. 2013). Récemment, il a été montré qu'ANO1 était surtout exprimé dans les cellules à mucus et dans les glandes sous-muqueuses (Huang et al. 2012).

Il a de plus été montré qu'ANO1 était essentiel pour la conductance CaCC dans d'autres tissus épithéliaux tels que ceux du pancréas, de la vésicule biliaire, des glandes salivaires et du rein (Pedemonte and Galietta 2014). L'expression d'ANO1 a également été détectée dans des neurones sensoriels où ANO1 aurait un rôle dans l'olfaction, la vision et la perception de la douleur. En plus d'être présent dans les cellules épithéliales, ce canal est très fortement exprimé dans les cellules interstitielles de Cajal de l'appareil digestif où il a un rôle dans l'activité pacemaker des muscles gastro-intestinaux (Pedemonte and Galietta 2014). ANO1 est également présent dans les cellules musculaires lisses des appareils respiratoire et reproducteur (Kunzelmann 2015) (Figure 23).

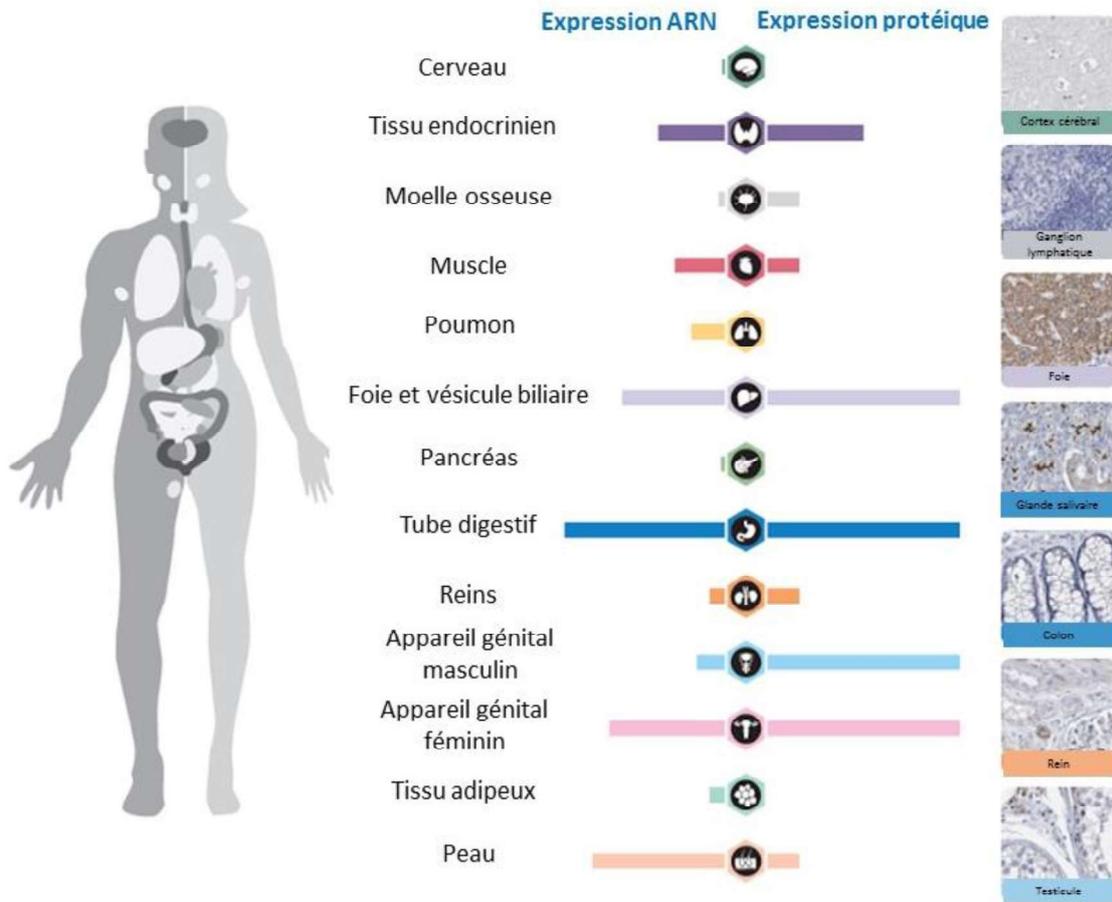


Figure 23 : Expression d'ANO1 en ARN et en protéines dans différents tissus. (D'après proteinatlas.org).

### 2.3. Fonctions d'ANO1 dans les voies aériennes

Du fait de sa présence dans de nombreux types cellulaires, le canal ANO1 est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques importants tels que la contraction des muscles lisses, la nociception ou la sécrétion de fluides au niveau des glandes salivaires. Il a également été montré qu'ANO1 était impliqué dans la migration et la prolifération cellulaire dans différents cancers (Qu et al. 2014).

Au niveau des voies aériennes, ANO1 joue un rôle dans différents processus et représente une cible thérapeutique potentielle dans la mucoviscidose (Pedemonte and Galletta 2014).

### 2.3.1. Apport de l'étude du modèle de souris KO pour ANO1

Le modèle de souris KO pour ANO1 a mis en évidence qu'un déficit d'expression et d'activité d'ANO1 pouvaient avoir de sérieuses conséquences. Lorsqu'ANO1 a été identifié comme CaCC en 2008, les effets d'une invalidation du gène étaient déjà connus. En effet, Rock *et al.* ont publié un article en 2008 montrant l'importance de la protéine ANO1 dans le développement de la trachée murine (Rock et al. 2008). Plus de 90% des souris KO pour ANO1 meurent dans leurs 9 premiers jours de vie (Figure 24) et présentent une croissance staturo-pondérale significativement diminuée par rapport à des souris sauvages (Rock et al. 2008). Les souris invalidées pour le gène *ANO1* présentent des trous ventraux dans les anneaux cartilagineux de la trachée et une accumulation de mucus entraînant une obstruction des voies aériennes et contribuant à la mortalité néonatale (Figure 24) (Rock et al. 2009). Une altération de la clairance mucociliaire a également été observée chez les souris KO pour ANO1 suggérant qu'ANO1 pourrait réguler la clairance mucociliaire au niveau des voies aériennes (Ousingsawat et al. 2009).

Le phénotype des souris KO pour ANO1 mime ainsi plusieurs éléments de l'atteinte pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose, à l'inverse des souris KO pour CFTR. Une des explications avancée est que la sécrétion de Cl<sup>-</sup> chez la souris serait majoritairement liée aux courants CaCC contrairement à ce qui est observé chez l'Homme où CFTR est responsable de la majorité des efflux Cl<sup>-</sup> au niveau des voies aériennes (Kunzelmann et al. 2009, Bonora et al. 2011, Gianotti et al. 2016).

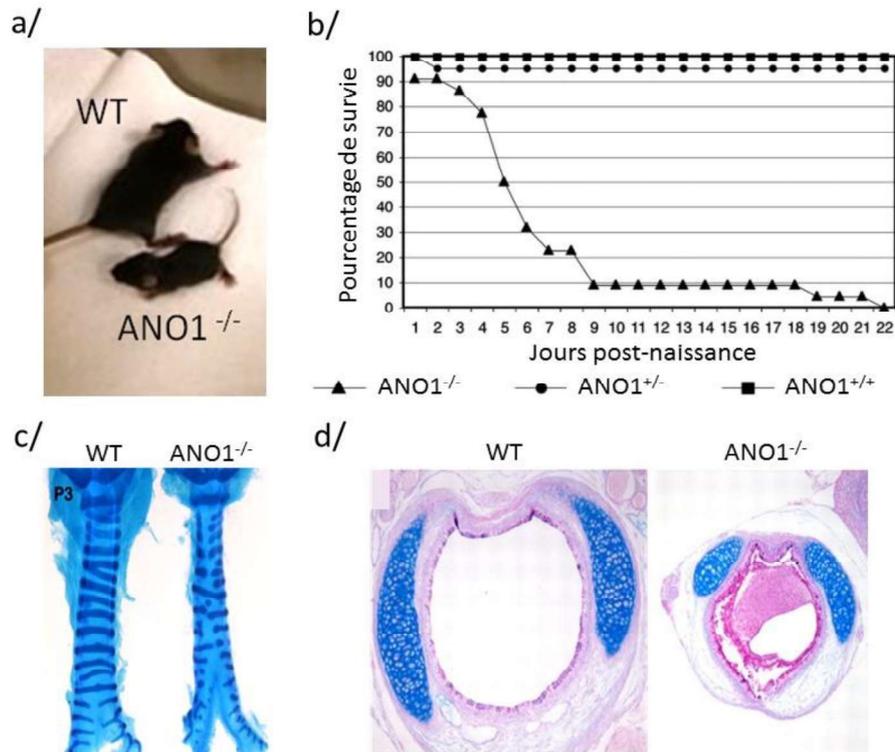


Figure 24 : Comparaisons de souris WT et souris KO pour ANO1.

a/ Photographie de souris sauvages (WT) et KO pour ANO1 (ANO1<sup>-/-</sup>). b/ Courbe de survie post-natale de souris sauvages, hétérozygotes pour ANO1 ou KO pour ANO1. c/ Vue ventrale de trachées de souris sauvages et KO pour ANO1 prélevées à 3 jours de vie et colorées au bleu Alcian pour mettre en évidence les anneaux cartilagineux de la trachée. d/ Coupes transversales de trachées de souris WT ou KO pour ANO1 colorées au bleu Alcian et à l'acide périodique de Schiff (rose) pour marquer respectivement le cartilage et le mucus. a (<http://www.med.unc.edu/cfpulmcenter/about-us/faculty/gabriel>) ; b et c (Rock et al. 2008) ; d (Rock et al. 2009).

### 2.3.2. ANO1 module la sécrétion de cytokines

Une étude a montré que la surexpression d'ANO1 induit une diminution de la sécrétion d'IL-8 indépendante de la voie purinergique sur des cellules épithéliales bronchiques CF. Les auteurs ont, en effet, étudié la sécrétion de différentes cytokines suite à la surexpression d'ANO1 en présence d'un chélateur du calcium, le 5,5'-diméthyl-BAPTA-AM, inhibant donc l'activation des récepteurs P2Y<sub>2</sub> (Veit et al. 2012). Les auteurs suggèrent que l'activation directe d'ANO1 au niveau des voies aériennes pourrait constituer une stratégie thérapeutique anti-inflammatoire pour les patients atteints de mucoviscidose.

### 2.3.3. ANO1 module la sécrétion de mucines

En 2008, ANO1 a été identifié comme CaCC par l'équipe de Galietta dans des cellules épithéliales humaines bronchiques en cherchant des gènes surexprimés par l'IL-4. La diminution d'expression d'ANO1 par l'utilisation d'un siARN entraîne une diminution significative des efflux chlorures activés par le calcium dans des cellules traitées avec de l'IL-4 mais également dans des cellules non stimulées (Caputo et al. 2008). Ces résultats indiquent qu'ANO1 est un composant essentiel des CaCC dans l'épithélium des voies aériennes. Le rôle physiologique de la surexpression d'ANO1 par les cytokines telles que l'IL-4 ou l'IL-13 est inconnu. Cependant, deux études récentes ont fourni une réponse possible. L'IL-4 et l'IL-13 sont de puissants inducteurs de la sécrétion de mucus et de la métaplasie des cellules à mucus dans les voies aériennes et il a été montré qu'ANO1 était spécifiquement exprimé dans les cellules à mucus et peu exprimé dans les cellules ciliées (Huang et al. 2012). Les auteurs notent une expression faible d'ANO1 dans l'épithélium des voies aériennes en conditions de repos, y compris dans les cellules à mucus. Cependant, l'induction de l'hyperplasie des cellules à mucus par le traitement des cellules épithéliales bronchiques humaines avec de l'IL-4 ou la sensibilisation de souris avec de l'ovalbumine (deux modèles mimant l'asthme) résultent en une augmentation du nombre de cellules co-exprimant ANO1 et MUC5AC (marqueur des cellules à mucus) (Figure 25). De façon intéressante, la co-expression spécifique d'ANO1 et MUC5AC a été confirmée dans les voies aériennes de patients asthmatiques (Huang et al. 2012). Scudieri *et al.* ont montré que suite à un traitement par de l'IL-4 pendant 24 à 72 heures, l'expression d'ANO1 est fortement augmentée dans des cellules épithéliales primaires bronchiques, avec une localisation à la membrane apicale (Figure 25). Le traitement à l'IL-4 augmente aussi le pourcentage de cellules exprimant MUC5AC. De façon intéressante, MUC5AC a été spécifiquement détecté dans les cellules exprimant ANO1. Les auteurs suggèrent que l'expression d'ANO1 est particulièrement requise sous des conditions d'hypersecretion du mucus pour assurer une sécrétion adéquate d'eau et d'électrolytes (Scudieri et al. 2012).

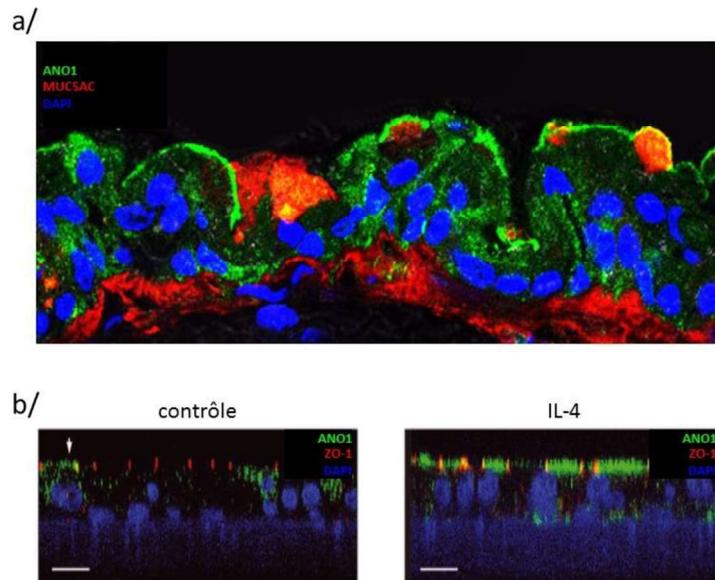


Figure 25 : Localisation cellulaire d'ANO1.

a/ ANO1 est sécrété dans les cellules à mucus dans l'épithélium de voies aériennes de souris sensibilisées avec de l'ovalbumine (vert : ANO1 ; rouge : MUC5AC ; bleu : DAPI). b/ L'expression d'ANO1 est augmentée à la membrane apicale de cultures primaires bronchiques humaines suite à une stimulation par de l'IL-4 (vert : ANO1 ; rouge : ZO-1 ; bleu : DAPI). a (Huang et al. 2012) ; b (Scudieri et al. 2012).

La surexpression d'ANO1 dans les cellules à mucus pourrait ainsi être un mécanisme favorisant la sécrétion et la fluidité du mucus.

### 2.3.4. ANO1 stimule la prolifération et la migration cellulaire

Ruffin *et al.* ont montré que la vitesse de prolifération et de migration des cellules est diminuée dans un modèle de lignée cellulaire épithéliale bronchique CF par rapport à des cellules non CF. Le rôle d'ANO1 dans la prolifération et la migration cellulaire a été mis en évidence dans des études sur des modèles de lignées cancéreuses (Qu et al. 2014). Une étude a montré qu'ANO1 est surexprimé et contribue aux cancers du sein, des cellules squameuses de la tête et du cou, du tractus aéro-digestif et de l'œsophage. Les auteurs ont démontré que l'inhibition d'ANO1 dans ces types de cellules cancéreuses induit une diminution de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, et réduit la croissance tumorale de xénogreffes (Britschgi et al. 2013).

Afin d'étudier le rôle d'ANO1 dans la réparation de l'épithélium pulmonaire, Ruffin *et al.* ont utilisé un siRNA dirigé contre ANO1 dans des cellules épithéliales bronchiques non CF et ont

montré une diminution significative de la vitesse de prolifération et de migration des cellules lorsque l'expression d'ANO1 est diminuée. Pour déterminer si ces diminutions étaient dues à la fonction canal d'ANO1, les auteurs ont étudié les vitesses de prolifération et de migration dans un modèle de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques en utilisant un inhibiteur pharmacologique d'ANO1 qui bloque seulement l'activité du canal, le T16Ainh-01 ou A01. Les auteurs ont montré que l'A01 induisait également une diminution de la vitesse de prolifération et de migration cellulaire. A l'inverse, les auteurs ont observé une augmentation significative de ces deux paramètres lorsqu'ANO1 était surexprimé. Cette étude suggère que l'utilisation d'activateurs spécifiques d'ANO1 pourrait permettre d'améliorer le processus de réparation de l'épithélium des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose.

### **2.3.5. ANO1 stimule la sécrétion d'ions bicarbonates**

Une étude a montré qu'ANO1 était impliqué dans la sécrétion d'ions bicarbonates. Jung *et al.* ont mis en évidence qu'ANO1 devient très perméable aux ions bicarbonates à de fortes concentrations calciques cytosoliques. Les auteurs ont montré que ce changement de perméabilité anionique du canal était dû à l'association directe d'ANO1 et de la calmoduline pour des concentrations en ions  $Ca^{2+}$  élevées (Jung *et al.* 2013). Dans le contexte de la mucoviscidose, la sécrétion de bicarbonates est altérée et mène à un mucus visqueux, les auteurs suggèrent qu'en agissant sur la sécrétion de bicarbonates, ANO1 pourrait pallier à ce problème de viscosité du mucus présent chez les patients CF.

### **2.3.6. ANO1 et mucoviscidose**

Très peu de travaux se sont attachés à étudier ANO1 dans la mucoviscidose. Au niveau des voies aériennes de patients CF, une étude a montré que l'activité des CaCC globaux était augmentée au niveau de l'épithélium nasal *in vivo* et sur des cultures de cellules épithéliales nasales (Knowles *et al.* 1991). En 1986, une autre équipe avait démontré la présence de courants chlorures supérieurs à la membrane apicale des cellules épithéliales des voies supérieures CF en présence de calcium libre (Frizzell *et al.* 1986). Une étude plus récente a permis d'observer une sous-expression des courants  $Cl^-$  induits par l'ATP dans les cultures

primaires de cellules épithéliales bronchiques et bronchiolaires issues de patients CF (F508del/F508del) par rapport à ceux observés dans des cultures non CF (Blouquit et al. 2006).

Ruffin *et al.* ont étudié l'activité spécifique du canal ANO1 dans des cellules épithéliales bronchiques CF *versus* non CF en quantifiant les efflux chlorures grâce à une sonde YFP fluorescente sensible aux ions halogénures. Les auteurs se sont assurés de la spécificité de la technique utilisée en mesurant les efflux chlorures liés à ANO1 ou à CFTR séparément en utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces deux canaux. Ainsi, les efflux chlorures liés à CFTR sont significativement diminués en présence de l'inh-172 alors qu'aucune variation n'apparaît avec le siARN d'ANO1, l'inverse est observé lorsque les efflux chlorures liés à ANO1 sont mesurés. Ruffin *et al.* ont montré que l'activité du canal ANO1 est réduite de façon significative dans des modèles de lignées cellulaires et cultures primaires épithéliales bronchiques CF par rapport aux modèles non CF (Figure 26). Les auteurs se sont alors intéressés à l'expression d'ANO1 dans différents modèles pulmonaires CF *versus* non CF et ont observé une diminution significative de l'expression d'ANO1 en ARNm dans un modèle de lignée cellulaire épithéliale bronchique CF (Figure 26), des poumons de souris homozygotes pour la mutation F508Del et dans des explants humains bronchiques issus de patients CF comparés à des modèles non CF. De la même façon, l'expression protéique d'ANO1 est significativement réduite dans des cultures primaires épithéliales bronchiques issues de patients CF cultivées en interface air-liquide par rapport à des cultures non CF. Les auteurs ont donc mis en évidence une diminution d'activité d'ANO1 liée à une diminution d'expression d'ANO1 dans divers modèles pulmonaires CF.

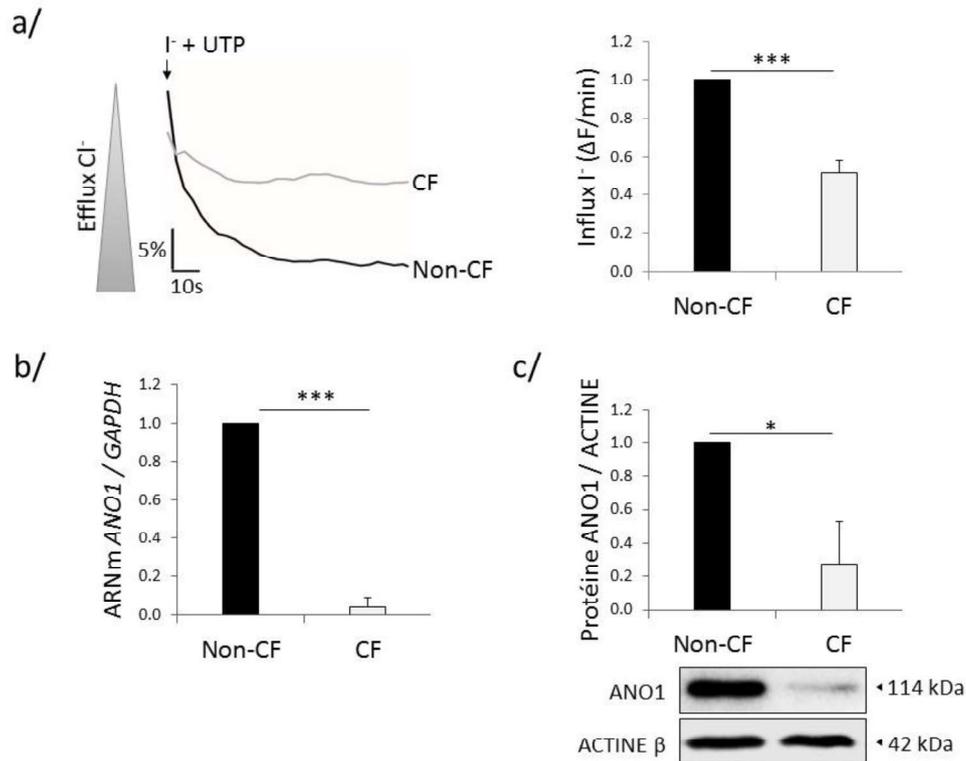


Figure 26 : L'activité et l'expression d'ANO1 sont diminuées dans la mucoviscidose.

a/ Efflux chlorures liés à ANO1 dans des cellules épithéliales bronchiques CF et non CF. b/ Quantification de l'expression en ARNm d'ANO1 rapportée à la GAPDH dans des cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o) et CF (CFBE41o). c/ Quantification de l'expression protéique d'ANO1 rapportée à l'actine  $\beta$  dans des cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o) et CF (CFBE41o). a, b et c (Ruffin et al. 2013)

## 2.4. ANO1 : cible thérapeutique dans la mucoviscidose

Une des stratégies thérapeutiques proposée dans la littérature pour compenser la déficience de CFTR dans les voies aériennes de patients atteints de mucoviscidose serait de stimuler une voie alternative de sécrétion d'ions chlorures. Dans les années 1980, l'existence des canaux chlorures activés par le calcium a été démontrée et les CaCC représentaient une cible thérapeutique intéressante. Aucune protéine n'étant reconnue comme responsable des efflux CaCC, une étude clinique ciblant les CaCC en général a vu le jour. Le mécanisme d'activation des CaCC via la stimulation des récepteurs purinergiques  $\text{P2Y}_2$  par l'UTP étant connu, un agoniste plus stable de l'UTP a été développé afin d'augmenter la conductance CaCC : le dénufosol tetrasodium (INS37217). Les résultats *in vitro* ont montré une amélioration de la viscosité du mucus, de la fréquence du battement ciliaire, une inhibition de l'absorption de sodium et une augmentation de l'hydratation des voies aériennes

(Kellerman et al. 2002). Des études cliniques ont donc été effectuées, la phase II de l'essai clinique a montré une amélioration significative de la fonction pulmonaire chez les patients CF (Deterding et al. 2007). Mais un essai de phase III incluant 466 patients n'a pas montré de bénéfice pulmonaire sur les patients CF (Ratjen et al. 2012), l'étude clinique s'est donc arrêtée. Une revue (Moss 2013) a cependant relevé quelques points permettant d'expliquer en partie cet échec :

- le dénofosol cible les CaCC de manière trop générale, en effet, au moment de l'étude clinique, aucun CaCC n'était identifié.
- l'effet du dénofosol est transitoire (de quelques secondes à quelques minutes), peut-être du fait qu'il active les CaCC *via* le calcium intracellulaire dont la concentration est très régulée au niveau cellulaire.
- sa demi-vie est très courte (3 heures dans l'épithélium nasal, 17 minutes dans les poumons de patients CF et 30 secondes dans le sang).
- la sélection de patients CF est apparue mauvaise avec des patients présentant un VEMS moyen de 92%, ce qui est « trop » élevé pour observer un réel effet thérapeutique.

L'identification d'ANO1 en 2008 comme CaCC et son implication dans de nombreux processus dérégulés chez les patients atteints de mucoviscidose en font donc une réelle cible thérapeutique. Son identification a, par conséquent, ouvert la voie au développement de molécules activatrices spécifiques qui permettraient, sans modifier la signalisation calcique, d'obtenir une activation plus soutenue dans le temps aboutissant à une meilleure efficacité.

Un criblage haut-débit d'une centaine de milliers de molécules en utilisant la lignée cellulaire épithéliale de rat FRT (*fisher rat thyroid*) avec une expression hétérologue d'ANO1 a permis d'identifier 6 classes d'activateurs d'ANO1 dont 2 n'entraînant pas d'augmentation de la concentration calcique cytosolique (Namkung et al. 2011). L'activateur  $E_{act}$  (*N*-(2-methoxyethyl)-*N*-(4-phenyl-2-thiazolyl)-2,3,4-trimethoxybenzeneacetamide) induit une activation importante et maintenue des courants CaCC liés à ANO1. Il induit également une

augmentation de la sécrétion de fluide par les cellules glandulaires bronchiques mais les mécanismes d'action de ces activateurs sont inconnus.

Aujourd'hui, ANO1 semble donc être une cible thérapeutique intéressante en étant indépendant du type de mutations de CFTR et dans la mesure où ce canal est impliqué dans de nombreux paramètres dérégulés dans le contexte de la mucoviscidose. Cependant, les raisons de la sous-expression d'ANO1 dans le contexte CF sont inconnues, les mécanismes de régulation de ce dernier n'étant pas totalement identifiés. Plusieurs travaux ont montré l'importance des microARN dans la régulation des gènes, je décrirai donc les connaissances sur les microARN dans la partie suivante.

## 3. Les microARN (miARN)

### 3.1. Généralités sur les miARN

#### 3.1.1. Découverte des miARN

Dans les années 90, des recherches menées par des laboratoires indépendants ont permis de mettre en évidence l'existence de petits ARN interférents endogènes : les microARN (ou miARN). C'est en 1993 que le premier miARN, *lin-4*, essentiel pour le contrôle du développement post-embryonnaire de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), est découvert par l'équipe d'Ambros (Lee et al. 1993). Le cycle de développement de *C. elegans* est composé de six stades successifs : l'embryogénèse, quatre stades larvaires (L1 à L4) et le stade adulte. Lee *et al.* ont montré que le développement larvaire se bloque au stade L1 chez des nématodes présentant une mutation du gène *lin-4*. Les auteurs démontrent que le gène *lin-4* ne code pas pour une protéine mais pour deux transcrits de petites tailles : *lin-4S* (22 nucléotides) et *lin-4L* (61 nucléotides). Une partie de la séquence de ces transcrits est partiellement complémentaire à des séquences contenues dans le 3'UTR (*untranslated region* ou région non traduite) de la protéine *lin-14*. Les auteurs suggèrent alors que *lin-4* régule négativement la traduction de *lin-14* *via* une interaction de type ARN-ARN antisens (Lee et al. 1993). Ce modèle de régulation a été validé la même année par Wightman et ses collègues qui démontrèrent, en utilisant des gènes rapporteurs, que la région 3'UTR de l'ARNm *lin-14* est nécessaire et suffisante pour la régulation de sa traduction par *lin-4* (Wightman et al. 1993). En 2000, un deuxième miARN (*let-7*) contrôlant le passage du stade larvaire L4 au stade adulte en réprimant la protéine *lin-41* est découvert chez *C. elegans*. *Lin-4* et *let-7* furent initialement nommés « *small temporal RNA* » (stRNA) (Pasquinelli et al. 2000) dû à leur rôle dans le contrôle du développement au cours du temps et renommés miARN en 2001 car ils peuvent être exprimés sans relation avec les étapes du développement (Lagos-Quintana et al. 2001).

Des orthologues de let-7 ont été retrouvés chez la drosophile, le mollusque, la souris et l'Homme (Pasquinelli et al. 2000). En 2001, la technique de clonage a permis d'identifier une centaine de miARN chez la drosophile, les nématodes et l'Homme (Lagos-Quintana et al. 2001). 55% des miARN de *C. elegans* ont des miARN orthologues dans le génome humain, ce qui démontre leur rôle important au cours de l'évolution animale (Ibanez-Ventoso et al. 2008). Aujourd'hui chez l'Homme, on dénombre 1 881 miARN séquencés et annotés dans le génome ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)).

### 3.1.2. Biosynthèse des miARN

La biosynthèse des miARN se fait en quatre étapes (Figure 27) : transcription du gène du miARN en transcrit primaire (pri-miARN), clivage en précurseur (pre-miARN), exportation dans le cytoplasme et clivage en miARN mature.

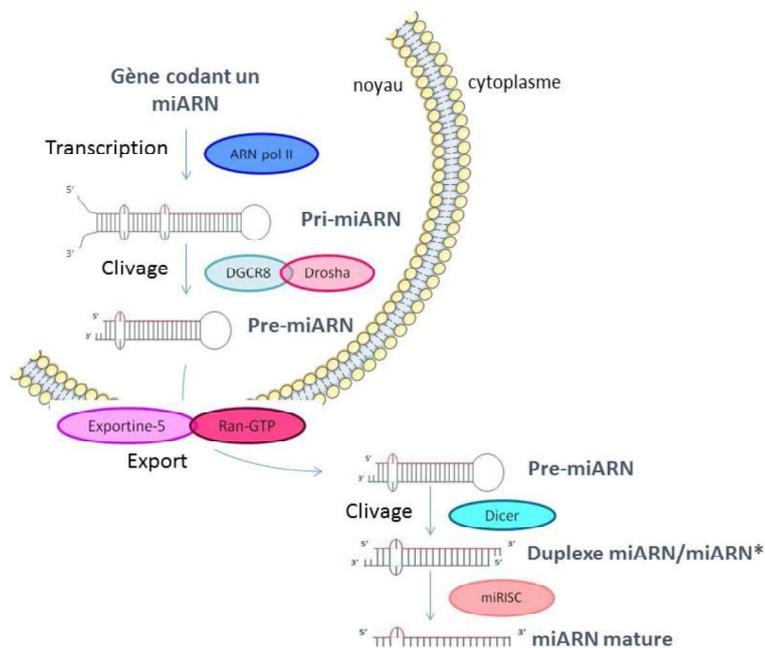


Figure 27 : Biogénèse des miARN.

#### a) Organisation génomique

Les gènes codant les miARN peuvent être, soit dans des unités géniques indépendantes et les miARN sont alors dits « intergéniques », soit dans des unités géniques codant pour des

pré-ARNm pouvant coder ou non pour des protéines. Dans ce cas, les miARN sont dits introniques ou exoniques (Figure 28) (Saini et al. 2008).

Les gènes des miARN peuvent être regroupés en « cluster », on parle de miARN polycistroniques lorsqu'ils sont sous la dépendance d'un même promoteur (Figure 28) (Ozsolak et al. 2008, Kapinas and Delany 2011).

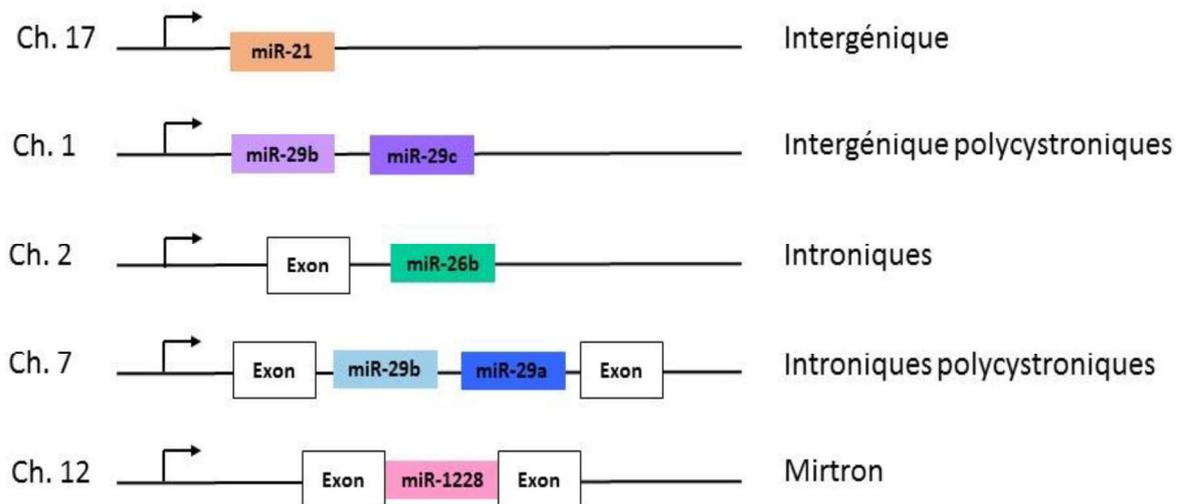


Figure 28 : Organisation génomique des miARN. D'après (Kapinas and Delany 2011)

### b) Transcription du pri-miARN

Les gènes codant les miARN sont transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II en transcrits primaires, les pri-miARN, de plusieurs centaines à plusieurs milliers de nucléotides. Ces transcrits primaires ont une structure typique composée d'une tige d'environ 33 paires de bases et une boucle terminale reliant les deux brins de la tige. Ces séquences possèdent, comme les ARNm, une coiffe caractérisée par la structure 7-méthyl-guanosine (m7G) à l'extrémité 5' et une queue poly-A à l'extrémité 3' (Cai et al. 2004, Lee et al. 2004).

### c) Maturation dans le noyau en pre-miARN

Le pri-miARN est clivé dans le noyau en un précurseur d'environ 70 nucléotides appelé pre-miARN (Gregory et al. 2004). Ce clivage est réalisé par un complexe protéique, appelé microprocesseur. Le microprocesseur est composé d'une protéase de type III appelée Drosha et d'une protéine de liaison à l'ARN double brin (ARNdb) DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*). Drosha ou DGCR8 ne peuvent pas cliver un pri-miARN de façon

isolée, seule l'association de ces deux protéines présente l'activité catalytique de maturation du pri-miARN (Gregory et al. 2004).

Le clivage du pri-miARN se fait de façon asymétrique sur les deux brins d'ARN de la tige provoquant la libération de la tige-boucle du pri-miARN. Le pre-miARN obtenu forme une structure tige-boucle possédant deux nucléotides non appariés à l'extrémité 3' et un groupement phosphate à l'extrémité 5' (Han et al. 2006) (Figure 29). La fixation de DGCR8 par son domaine de liaison à l'ARNdb au niveau de la jonction simple brin-double brin permettrait au domaine de liaison à l'ARNdb de Drosha de réaliser le clivage du pri-miARN (Han et al. 2006).

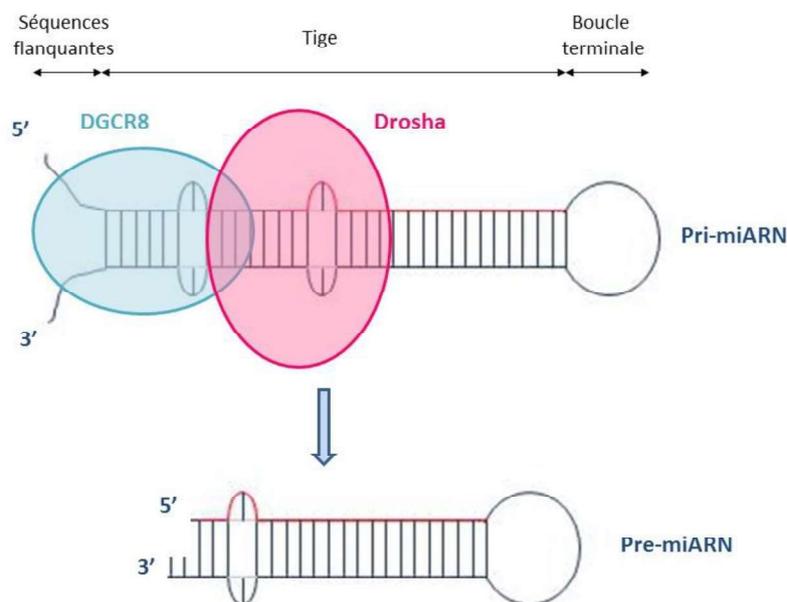


Figure 29 : Maturation en pre-miARN par le complexe microprocesseur.  
D'après (Han et al. 2006).

Des mécanismes de régulation du complexe microprocesseur ont été décrits pour certains miARN. Fukuda *et al.* ont montré que les ARN hélicases p68 et p72 jouent un rôle de facteurs auxiliaires au microprocesseur en favorisant la sélection et la maturation de certains pri-miARN spécifiques (Fukuda et al. 2007). Par ailleurs, les protéines SMAD impliquées dans la transduction du signal de la voie TGF- $\beta$  peuvent également réguler le microprocesseur en facilitant la maturation par Drosha (Davis et al. 2008). D'autres facteurs peuvent réguler négativement la maturation de certains pri-miARN par le microprocesseur comme les

enzymes ADAR (*Adenosine deaminase acting on RNA*) qui inhibent le clivage par Drosha (Yang et al. 2006). Enfin, le complexe s'autorégule : DGCR8 stabilise Drosha par leur interaction protéine-protéine et Drosha régule négativement l'expression de DGCR8 en clivant une structure tige-boucle en 5' de l'ARNm de DGCR8, ce qui induit sa dégradation (Han et al. 2009).

Certains miARN ne nécessitent pas de clivage par le microprocesseur et sont générés directement par épissage. En effet, une autre voie de génération des pre-miARN est la voie des mirtrons (Figure 28). Cette voie concerne des miARN codés dans de courts introns. L'intron libéré après épissage se structure en forme de tige-boucle et les extrémités 5' et 3' correspondent respectivement aux sites d'épissage donneurs (AG) et accepteurs (GU).

#### d) Export dans le cytoplasme

Les pre-miARN sont ensuite exportés dans le cytoplasme pour y subir une autre étape de maturation. L'export des pre-miARN du noyau vers le cytoplasme se fait par l'exportine-5 qui appartient à la famille des karyophérines  $\beta$ , responsables du transport de protéines du noyau vers le cytoplasme (Lund et al. 2004). L'exportine-5 se lie directement et spécifiquement au cofacteur Ran-GTP dans le noyau, puis se fixe aux nucléoporines pour permettre le passage du pre-miARN du noyau au cytoplasme. La formation du complexe pre-miARN-exportine-5-Ran-GTP protège le pre-miARN de la dégradation par des nucléases. L'hydrolyse du Ran-GTP en Ran-GDP par la Ran-GAP dans le cytoplasme permet la dissociation du complexe et ainsi la libération du pre-miARN.

#### e) Maturation cytoplasmique du pre-miARN

Lorsque le pre-miARN est dissocié du complexe permettant son transport, il est clivé dans le cytoplasme par une deuxième RNase de type III, l'enzyme Dicer, qui va permettre de terminer sa maturation (Hutvagner et al. 2001). Ce clivage élimine la boucle du pre-miARN et génère un duplex miARN-miARN\* d'environ 20 pb avec des extrémités 3' sortantes de deux nucléotides (nt) de chaque côté. L'un des deux brins du duplex miARN-miARN\* est appelé le brin guide ou miARN mature et l'autre brin, miARN\*. Dicer interagit avec des protéines de liaison à l'ARNdb : TRBP (*transactivating response RNA-binding protein*) et/ou PACT (*protein*

*activator of the interferon-induced protein kinase*). Ces protéines ne sont pas indispensables à l'activité catalytique de Dicer mais semblent le stabiliser (Lee et al. 2006).

Le brin miARN mature se fixe à un complexe multiprotéique appelé RISC (*RNA-induced silencing complex*) formé de Dicer et d'une endonucléase de la famille des protéines Argonaute. Le complexe pré-RISC est constitué de Dicer-TRBP, d'une protéine de la famille Argonaute et du duplex miARN-miARN\*. Le complexe RISC est activé par la dissociation du duplex. Le complexe miARN mature-RISC va se fixer sur l'ARNm cible du miARN et ainsi réprimer l'expression post-transcriptionnelle de sa cible. Le miARN\* va lui, généralement être dégradé. La sélection du brin mature au sein du duplex dépend de la stabilité thermodynamique des extrémités du duplex : le brin le plus faiblement apparié à son extrémité 5' est majoritairement incorporé au complexe RISC.

#### f) Appariement à l'ARNm cible

La régulation exercée par les miARN est spécifique grâce à l'appariement du miARN mature contenu dans le complexe miRISC avec une séquence partiellement complémentaire située généralement dans le 3'UTR de l'ARNm cible et appelée MRE (*miRNA response element*). La séquence MRE est majoritairement située dans le 3'UTR des ARNm mais différentes études ont montré l'existence de MRE fonctionnels au niveau des séquences codantes ORF (*open reading frame*) ou dans le 5'UTR de l'ARNm.

Il existe certaines règles établies par des analyses expérimentales et informatiques pour prédire la fixation d'un miARN mature sur son ARNm cible. Le critère le plus important est un appariement parfait entre l'ARNm cible et les nucléotides 2-7 en 5' du miARN appelés région *seed* du miARN (Lewis et al. 2005), cet appariement est suffisant pour réprimer l'ARNm cible. Des mésappariements sont généralement présents dans la région centrale. Enfin, un appariement minimal en 3' du miARN est généralement observé pour stabiliser l'interaction du miARN à sa cible. Dans certains cas, un appariement étendu dans la région 3' du miARN peut compenser un mésappariement de la région *seed* (Bartel 2009).

D'autres facteurs interviennent dans la reconnaissance de l'ARNm cible par le miARN. La structure secondaire de l'ARNm et en particulier l'accessibilité de la séquence MRE influence la fonctionnalité du miARN sur sa cible (Kertesz et al. 2007).

### 3.1.3. Nomenclature des miARN

Une nomenclature des miARN a été mise au point selon plusieurs critères (Griffiths-Jones et al. 2006). Les miARN matures sont notés « miR », et leur organisme d'origine est indiqué par trois lettres en préfixe comme par exemple hsa pour *homo sapiens* ou mmu pour *mus musculus*. Lorsqu'un pre-miARN donne lieu à deux miARN matures, différentes annotations peuvent être retrouvées telles que :

- miR-X et miR-X\* avec miR-X\* représentant le miARN mature le moins abondant des deux brins.

- miR-X-5p et miR-X-3p avec 5p représentant le brin 5' de la tige-boucle du pre-miARN et 3p le brin 3'.

Certaines familles de miARN matures se différencient par quelques bases seulement. Cette différence est indiquée par une lettre en suffixe, comme par exemple miR-19a et miR-19b :

miR-19a : AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA

miR-19b : AGUUUUGCAGGUUUGCACCAGC

Enfin, un miARN mature peut provenir de la maturation de régions chromosomiques différentes, un deuxième suffixe chiffré est alors ajouté : le miR-19b-1 provient du chromosome 14 et le miR-19b-2 du chromosome X.

### 3.1.4. Mode d'actions des miARN

Les miARN régulent l'expression post-transcriptionnelle des gènes en inhibant leur traduction ou en dégradant les ARNm. Cette régulation dépend de la complémentarité du miARN à l'ARNm cible : si la complémentarité des bases est parfaite, le complexe miARN-RISC va dégrader l'ARNm cible ; à l'inverse, si la complémentarité est imparfaite, la traduction de l'ARNm va être inhibée (Filipowicz et al. 2008).

Les miARN sont capables d'altérer la traduction et la stabilité de l'ARNm en interférant avec la fonction du complexe eIF4F (*eukaryotic Initiation Factor 4F*) et la PABPC (*Cytoplasmic Poly(A)-Binding Protein*) qui sont impliqués dans la traduction des ARNm. Le complexe RISC peut également entraîner la déstabilisation des transcrits par le recrutement d'enzymes de déadénylation (Huntzinger and Izaurralde 2011). La dégradation des ARNm par les miARN engage la présence de P-bodies (*processing-bodies*) riches en enzymes et cofacteurs impliqués dans la dégradation des ARNm.

Dans certains cas particuliers, il a été décrit que les miARN peuvent activer la traduction. Vasudevan *et al.* ont montré que le miR-369 se fixe au 3'UTR du TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) et que cette fixation entraîne une activation de la traduction du TNF $\alpha$  mais uniquement lorsque les cellules sont déprivées en sérum. Les auteurs concluent que miR-369 joue un rôle de répresseur de la traduction dans des cellules en prolifération et d'activateur lors de l'étape d'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Vasudevan and Steitz 2007). Des cas d'activation de la traduction par fixation du miARN en 5'UTR de l'ARNm ont également été décrits, comme pour le miR-122. Ce miARN spécifique du foie stimule la réplication de l'ARN du virus de l'hépatite C (HCV) en se fixant à son 5'UTR (Henke et al. 2008).

### 3.1.5. Outils bio-informatiques pour la prédiction des sites cibles

Deux approches sont utilisées pour étudier la régulation des ARNm par les miARN : l'approche gène candidat et l'approche globale par miRNome (Sonneville et al. 2015).

L'approche gène candidat est empirique, elle est basée sur des analyses *in silico* et nécessite une validation biologique. Plusieurs bases de données (DIANAmicroT, TargetScan, miRWalk, miRanda, PicTar) ont été développées afin de prédire les cibles des miARN dans les régions 3'UTR des ARNm chez les mammifères. Celles-ci sont basées sur plusieurs critères (Dweep et al. 2013, Peterson et al. 2014), comme par exemple :

- la complémentarité entre la région *seed* du miARN et le 3'UTR du gène cible
- la conservation des sites cibles entre espèces
- la stabilité thermodynamique du duplexe miARN-3'UTR cible
- la multiplicité des sites de liaison des miARN sur le même 3'UTR cible
- l'accessibilité du site cible.

Chaque base de données utilise un algorithme différent, il est donc important d'étudier les prédictions de plusieurs bases et de les recouper.

L'approche globale consiste à étudier l'expression différentielle de plusieurs miARN entre différents modèles sans *a priori*. Cette comparaison peut être effectuée par différentes méthodes comme le *microarray*, le séquençage NGS (*next generation sequencing*) ou la PCR *arrays*.

Ces deux approches sont complémentaires et répondent à des besoins différents.

### 3.1.6. Fonctions physiologiques des miARN

Plus de 60% des gènes seraient régulés par les miARN (Friedman et al. 2009). Un miARN peut en effet réguler de nombreuses cibles et chaque gène peut être régulé par plusieurs miARN. Il a été montré que les miARN ont un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques : développement, différenciation, prolifération, etc. Ce mécanisme de contrôle de l'expression des gènes par les miARN fait l'objet de perturbations importantes dans les contextes pathologiques où des dérégulations de l'expression des miARN sont observées.

## 3.2. MicroARN et mucoviscidose

Alors que de nombreuses études ont étudié le rôle des miARN dans la régulation du gène *CFTR*, peu d'attention a été portée à d'autres aspects tels que l'infection, l'inflammation ou l'obstruction des voies aériennes dans le contexte de la mucoviscidose.

### 3.2.1. Régulation de *CFTR* par les miARN

Plusieurs équipes ont étudié le rôle des miARN dans la mucoviscidose, en particulier sur la régulation de l'expression du gène *CFTR* sauvage ou muté. L'ARNm de *CFTR* est peu abondant dans l'épithélium des voies aériennes et les miARN pourraient réguler les ARNm peu abondants plus efficacement que les ARNm fortement exprimés (Mukherji et al. 2011, Ramachandran et al. 2013). A l'aide d'analyses *in silico*, Gillen et al. ont identifié des miARN qui régulent directement *CFTR* en se liant à son 3'UTR (Gillen et al. 2011). Les auteurs ont

montré que la régulation du gène *CFTR* diffère selon le modèle utilisé. Ils ont également démontré que certains miARN régulant *CFTR*, ciblent également le co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  NKCC1 suggérant un rôle général des miARN dans la coordination du transport d'ions chlorures à travers la membrane des cellules épithéliales. Megiorni et al. ont également utilisé une approche gène candidat pour démontrer *in vitro* que miR-101 et miR-494 régulent l'expression de la protéine *CFTR* dans des cellules HEK293 lorsqu'ils sont utilisés seuls. La régulation de *CFTR* par ces deux miARN est encore plus forte lorsqu'ils sont utilisés en combinaison (Megiorni et al. 2011). Une autre équipe a également montré que le miR-101 régule *CFTR* : Hassan et al. ont montré que les polluants de l'air diminuent l'expression de *CFTR* et augmentent l'expression de miR-101 et miR-144 dans un modèle de lignée cellulaire épithéliale bronchique. Les auteurs ont également noté une surexpression de miR-101 dans les poumons de patients atteints de bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO), caractérisés par une faible expression de *CFTR* (Hassan et al. 2012). Cette approche gène-candidat est cependant limitée par les outils de prédiction des bases de données.

Deux équipes ont donc étudié l'expression globale des miARN entre des modèles CF et non CF avant de se rapporter aux analyses *in silico*. Ramachandran et al. ont trouvé que le miR-138 était prédit pour cibler le facteur de transcription SIN3A (*SIN3 homolog A*), capable de se lier à *CFTR*. Ils ont démontré que SIN3A est une cible de miR-138 dans l'épithélium des voies aériennes et que miR-138 régule donc indirectement l'expression de *CFTR* (Figure 30). La surexpression de miR-138 augmente l'expression et l'activité de *CFTR* à la surface des cellules exprimant *CFTR* sauvage mais aussi *CFTR*-F508del (Figure 30). Les auteurs ont donc suggéré que miR-138 pourrait être une cible thérapeutique pour restaurer la fonction de *CFTR* (Ramachandran et al. 2012). L'équipe de Greene a été la première à reporter un lien direct entre les miARN et l'expression de *CFTR* dans le contexte CF (Oglesby et al. 2013). Cette équipe a montré une régulation directe de *CFTR* par miR-145, miR-223 et miR-494, seuls et avec un effet synergique lorsqu'ils sont utilisés en combinaison. Ramachandran *et al.* ont démontré que *CFTR* est directement régulé par miR-509-3p et miR-494 qui agissent ensemble et induisent une plus forte répression (Ramachandran et al. 2013).

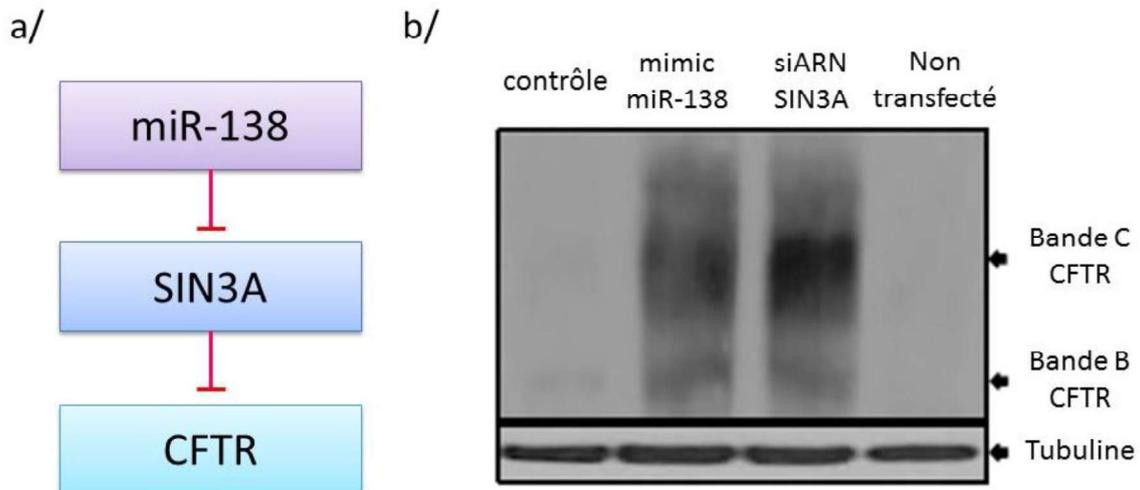


Figure 30 : Régulation de CFTR par le miR-138.

a/ Régulation indirecte de CFTR par le miR-138 *via* SIN3A. b/ Western-blot représentatif de l'expression protéique de CFTR dans des cellules primaires de patients CF (homozygotes F508del) transfectées avec un contrôle, un mimic de miR-138, un siARN SIN3A ou non transfectées. D'après (Ramachandran et al. 2012).

La régulation de CFTR par les miARN semble donc complexe et dépendante de nombreux paramètres. En effet, Viart *et al.* ont récemment décrit que la régulation de CFTR est modifiée avant et après la naissance confirmant des résultats précédents (Marcorelles et al. 2007). Alors que le canal CFTR est très fortement exprimé durant le développement fœtal, l'expression de CFTR est très faible au niveau pulmonaire après la naissance. Les auteurs ont démontré que la régulation de CFTR par les miARN et les facteurs de transcription est tissu-spécifique et dépendante du temps, ainsi, le miR-101 régule négativement CFTR dans des lignées cellulaires pulmonaires adultes mais n'a aucun effet sur des cellules épithéliales bronchiques fœtales. De façon intéressante, les auteurs ont fait synthétiser des MBBO (*miRNA-binding blocker oligonucleotides*) qui vont se fixer au 3'UTR de CFTR et empêcher la fixation des miR-101 et miR-145 à ce dernier. Des augmentations de l'expression et de l'activité de CFTR sont observées lorsque ces MBBO sont transfectés dans des cellules épithéliales bronchiques CF suggérant que ces MBBO pourraient être utilisées en thérapeutique chez le patient (Viart et al. 2015).

Il a aussi été montré que des polymorphismes présents dans la région 3'UTR de CFTR permettent la fixation de miR-509-3p et entraînent ainsi une diminution de l'expression de CFTR (Amato et al. 2013). Les mêmes auteurs ont démontré que l'utilisation d'un petit

peptide nucléique, modifié chimiquement afin d'augmenter sa résistance à la dégradation par les nucléases et complémentaire à la région *seed* du miR-509-3p, permet d'augmenter l'expression de CFTR (Amato et al. 2014). Enfin, une cohorte de patients CF homozygotes pour la mutation F508del a été étudiée afin d'identifier des SNP (*single nucleotide polymorphism*) potentiels dans le cluster hsa-miR-99b/hsa-let-7e/hsa-miR-125a contenu dans une région prédite pour contenir des gènes modificateurs. Les auteurs ont identifié trois polymorphismes dans ce cluster qui modulent l'expression de ces miARN et qui pourraient être associés aux phénotypes des patients (Endale Ahanda et al. 2015).

De nouvelles études sont donc nécessaires pour comprendre l'effet des miARN sur le gène CFTR et envisager une utilisation thérapeutique. Les différents sites de liaisons des miARN régulant CFTR dans les cellules pulmonaires sont représentés sur la Figure 31.

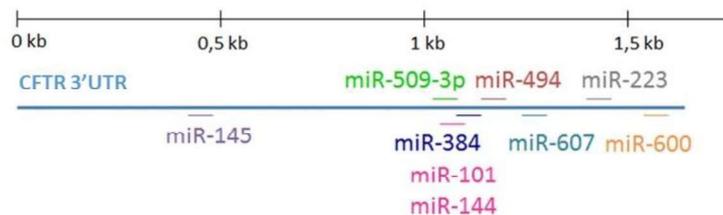


Figure 31 : Localisation des sites de liaison des miARN sur le 3'UTR de CFTR. D'après (Sonneville et al. 2015).

### 3.2.2. Régulation de l'inflammation par les miARN

Il existe chez les patients CF une inflammation chronique des voies aériennes. Les origines de cette inflammation sont inconnues mais pourraient impliquer les miARN. Différentes approches ont été utilisées pour étudier le rôle de ces derniers dans l'inflammation dans le contexte CF. La première étude à avoir montré une dérégulation de l'expression des miARN dans les cellules CF a été effectuée par Oglesby et ses collaborateurs qui ont utilisé une approche globale (Oglesby et al. 2010). Les auteurs ont montré que le miR-126 était sous-exprimé dans différents modèles CF *in vivo* et *in vitro* par rapport aux modèles non CF, et que ce miARN ciblait la protéine TOM1 (*target of myb1*) et la voie NF- $\kappa$ B. Ils ont de plus démontré qu'il était possible de délivrer des pre-miARN fonctionnels dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques CF en utilisant des nanoparticules (McKiernan et al. 2013).

De la même façon, Bhattacharyya et al. ont recherché, dans une banque de miARN issus de lignées cellulaires épithéliales CF et non CF, un miARN associé au phénotype pro-inflammatoire du poumon CF (Bhattacharyya et al. 2011). Ils ont observé une surexpression de miR-155 dans les cellules CF *in vitro* et *in vivo*, et un lien entre l'activité de CFTR et l'expression de miR-155. A l'aide d'analyses bio-informatiques et d'expériences *in vitro*, les auteurs ont mis en évidence une régulation directe de la protéine SHIP1 (*Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 protein*) par miR-155. Cette régulation affecte indirectement l'expression de la chimiokine IL-8 *via* l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt et l'inhibition de la voie MAPK. Ces auteurs se sont intéressés aux raisons de la dérégulation de l'expression du miR-155 dans le contexte CF et ont montré que la surexpression de miR-155 dans les cellules CF était médiée par les protéines TTP (tristetrapoline) et KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*), connues pour réguler la biogénèse des miARN (Bhattacharyya et al. 2013). D'autres études ont montré que l'IL-8 est directement régulé par le miR-93 et le miR-17, l'expression de ce dernier étant diminuée dans différents modèles CF (Fabbri et al. 2014, Oglesby et al. 2015). De manière intéressante, ces deux miARN appartiennent à la même famille (Oglesby et al. 2015). Dans une étude s'intéressant à l'inflammation, Ramachandran et ses collègues ont identifié un site de liaison pour NF- $\kappa$ B sur deux miARN régulant CFTR et ont montré que l'expression et la fonction de CFTR diminuent quand NF- $\kappa$ B est fonctionnel (Ramachandran et al. 2013). Les processus inflammatoires sous le contrôle de NF- $\kappa$ B influencent donc l'expression des miARN et régulent CFTR en retour.

L'inflammation dans la mucoviscidose est également liée à la dérégulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ 1 *via* les protéines SMAD3. Une étude a montré que le miR-145 régule l'expression de SMAD3 et que les niveaux d'expression de miR-145 et SMAD3 sont négativement corrélés dans des cellules épithéliales respiratoires nasales issues de patients CF (Megiorni et al. 2013). Il a de plus été montré que la dérégulation du miR-31 dans les voies aériennes CF contribue à l'inflammation pulmonaire *via* une activité augmentée de la cathepsine S qui va dégrader des protéines antimicrobiennes (Weldon et al. 2014). Enfin, le miR-221 régule le facteur de transcription ATF6 (*activating transcription factor 6*) impliqué dans l'inflammation médiée par le stress du réticulum endoplasmique (Oglesby et al. 2015).

Une étude récente a mis en évidence le fait qu'il était possible d'améliorer l'hyper-inflammation pulmonaire de macrophages CF grâce à une molécule, le celecoxib qui va moduler l'axe AKT/miR-199a-5p/CAV1 (Zhang et al. 2015).

Ces études mettant en évidence de nombreux liens entre les miARN et l'inflammation dans la mucoviscidose suggèrent de nouvelles stratégies dans le but de diminuer l'inflammation chez les patients CF.

### 3.2.3. Régulation de l'obstruction bronchique et de l'infection

La déshydratation du liquide de surface des voies aériennes chez le patient CF entraîne un épaissement du mucus qui devient visqueux et une altération de la clairance mucociliaire qui vont à long terme dégrader la fonction respiratoire. La mucine MUC5AC est un composant majeur du mucus des voies aériennes dont la production est stimulée par l'élastase des neutrophiles. Une étude a mis en évidence la régulation de MUC5AC par miR-146a (Zhong et al. 2011). Une meilleure compréhension de la régulation de cette protéine pourrait permettre d'adapter les traitements des patients CF. L'équipe de Pascal Barbry s'est, quant à elle, intéressée à la multiciliogénèse chez les Vertébrés. Les auteurs ont étudié le profil d'expression des miARN avant et après multiciliogénèse dans des modèles de cultures primaires de cellules épithéliales des voies aériennes humaines cultivées en interface air-liquide et dans l'épiderme d'embryon de Xénope (Marcet et al. 2011). Le même miARN, miR-449, a été trouvé comme surexprimé pendant le processus de multiciliogénèse dans les deux modèles et stimule ce processus en réprimant directement la voie Delta/Notch, connue pour être associée à la prolifération et à la différenciation cellulaire.

La présence d'un mucus visqueux et épais favorise la colonisation des voies aériennes CF par différents pathogènes tels que *H. influenza*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Deux équipes ont étudié les effets de l'infection par *P. aeruginosa* et *S. aureus* et ont montré que l'expression des miARN ciblant CFTR était augmentée suite à l'infection (Oglesby et al. 2013, Ramachandran et al. 2013). La présence de pathogènes dans l'épithélium des voies aériennes CF module donc l'expression des miARN qui vont à leur tour réguler CFTR. Fabbri *et al.* ont montré une corrélation entre les niveaux d'expression d'IL-8 et de miR-93 lors de

l'infection par *P. aeruginosa* dans des cellules épithéliales bronchiques et proposent un traitement combiné basé sur l'utilisation de différents pre-miARN régulant l'IL-8 pour diminuer l'infection chez les patients CF (Fabbri et al. 2014).

Dans le Tableau 1, nous avons recensé les différents miARN dont l'expression est modulée et qui régulent CFTR et d'autres protéines dans le contexte CF. Ces données indiquent de nouveaux mécanismes qui influencent l'expression de CFTR et le développement de la pathologie, et ouvrent donc la recherche vers de nouvelles thérapies.

Année	miARN	Cible directe	Cible indirecte	Modèles	Référence
2010	miR-126	TOM1	-	Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	(Oglesby et al. 2010)
2011	miR-155	SHIP1	IL-8	IB-3, S9	(Bhattacharyya et al. 2011)
2011	miR-494, miR-384, miR-376b, miR-1246, miR-145, miR-331-3p et miR-939	CFTR	-	Caco-2	(Gillen et al. 2011)
	miR-600, miR-494, miR-384, miR-1290, miR-1246, miR-145, miR-1827, miR-331-3p et miR-939	CFTR	-	PANC-1	
	miR-600, miR-494, miR-607 et miR-384	CFTR	-	16HBE14o-	
	miR-101, miR-1246, miR-494 et miR-384	SLC12A2	-	PANC-1	

2011	miR-449	Notch1	-	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide	(Marcet et al. 2011)
2011	miR-101 et miR-494	CFTR	-	HEK293	(Megiorni et al. 2011)
2012	miR-138	SIN3A	CFTR	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide, Calu-3, HEK293, HeLa	(Ramachandran et al. 2012)
2012	miR-101 et miR-144	CFTR	-	16HBE14o-	(Hassan et al. 2012)
2013	miR-145, miR-223, miR-494	CFTR	-	Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	(Oglesby et al. 2013)
2013	miR-145	SMAD3	-	Epithelium nasal de patients, HEK293	(Megiorni et al. 2013)
2013	miR-509-3p et miR-494	CFTR	-	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide, Calu-3	(Ramachandran et al. 2013)

2014	miR-31	IRF1	Cathepsine S	Cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide, 16HBE14o-, CFBE41o-	(Weldon et al. 2014)
2014	miR-93	IL-8	-	IB3, CuFi-1, NuLi-1	(Fabbri et al. 2014)
2015	miR-145, miR-384, miR-101, miR-600	CFTR	-	A549	(Viart et al. 2015)
	miR-505, miR-943, miR-377, miR-384, miR-101, miR-600	CFTR	-	Beas-2B	
	miR-600	CFTR	-	HBEpiC	
2015	miR-17	IL-8	-	Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	(Oglesby et al. 2015)
2015	miR-221	ATF6	-	Brossages bronchiques, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	(Oglesby et al. 2015)
2015	miR-199a-5p	CAV1	-	Macrophages alvéolaires humains et murins	(Zhang et al. 2015)

**Tableau 1 : miARN dérégulés et leurs cibles dans le contexte CF.**  
D'après (Sonneville et al. 2015).

### 3.3. MicroARN : biomarqueurs et thérapeutiques

#### 3.3.1. MicroARN en tant que biomarqueurs

La recherche de biomarqueurs afin d'améliorer le dépistage, le diagnostic et d'appréhender la réponse des patients à un traitement donné est un enjeu de premier ordre pour la médecine moderne et concerne toutes les disciplines.

De manière idéale, les biomarqueurs doivent être fiables, sensibles et peu invasifs. Les fluides corporels tels que le sérum, l'urine, les larmes étant facilement accessibles, la présence de biomarqueurs dans ces fluides est donc intéressante. La découverte des miARN dans ces fluides en font donc de très bons candidats comme biomarqueurs (Chen et al. 2008). Plusieurs caractéristiques des miARN suggèrent en effet leur potentiel rôle de biomarqueurs. Les miARN sont très résistants à la dégradation, ils représentent donc des candidats idéaux comme biomarqueurs pour le diagnostic de cancers ou d'autres pathologies. Différentes études ont montré que les miARN sont très stables dans le sérum ou le plasma malgré la présence de ribonucléases dans le sang. Mitchell *et al.* ont montré qu'après une incubation de plasma à température ambiante pendant 24h, le niveau de miARN circulants ne diminuait pas (Mitchell et al. 2008). Chen *et al.* ont également montré que les miARN issus du sérum sont résistants à la digestion par la RNase A, à de nombreux cycles de congélation/décongélation et sont insensibles à des modifications du pH (Chen et al. 2008). Ces arguments ont mené de nombreux groupes, et plus particulièrement ceux travaillant sur le cancer, à évaluer les miARN comme des biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques. Des différences d'expression des miARN issus du sérum séparent correctement les individus sains d'individus malades, par exemple des patients atteints d'un cancer du poumon. Le premier miARN exprimé de manière aberrante dans le cancer du poumon fut identifié en 2004. Un faible niveau d'expression de let-7 est associé à un faible taux de survie chez des patients ayant eu une résection chirurgicale d'un cancer du poumon à petites cellules (Takamizawa et al. 2004). Deux mécanismes peuvent expliquer la modification des niveaux d'expression des miARN circulants : le relargage passif des miARN

lié à une lyse tissulaire provoquée par la maladie, ou les miARN pourraient avoir un rôle pathogénique et participer à l'évolution de la maladie.

Une étude multicentrique (Keller et al. 2011) a montré que le profil d'expression des miARN dans le sang pouvait diagnostiquer différents types de maladies. Les auteurs ont étudié le profil d'expression de 863 miARN *via* la technique de puce *microarray* sur des échantillons sanguins issus d'individus humains atteints de différents cancers (poumons, prostate, ovaires, ...), de différentes maladies (pancréatite, BPCO, sarcoïdose, ...) ou d'individus sains. Les auteurs ont validé ce miRNOME par qPCR. Ils ont observé des profils d'expression des miARN dérégulés pour toutes les maladies testées : 62 miARN sont dérégulés dans au moins six maladies comparés à leur expression chez les individus sains. L'analyse des voies de signalisation a confirmé l'association de la maladie avec la dérégulation de miARN. Enfin, les auteurs ont noté une corrélation significative entre la localisation génomique des variants génétiques associés à la maladie et les miARN dérégulés.

Les miARN circulants sont principalement retrouvés sous la forme de quatre types de structures différentes : microvésicules, exosomes, corps apoptotiques et lipoprotéines (Baulande et al. 2014). Une base de données des miARN circulants appelée miRandola qui recense les miARN extracellulaires a été récemment développée (Russo et al. 2012). Weber et al. ont montré que de nombreux fluides biologiques tels que la salive, l'urine ou les larmes contiennent des quantités significatives et stables de miARN (Weber et al. 2010). Les auteurs ont observé un profil d'expression des miARN hétérogène selon le fluide biologique (Tableau 2).

Nature du fluide	Liquide amniotique	Lait maternel	Lavage bronchique	Liquide céphalo-rachidien	Colostrum	Liquide péritonéal	Plasma	Liquide pleural	Salive	Liquide séminal	Larmes	Urines
Concentration (µg/l)	570	47 240	1 128	111	585	775	308	470	1 945	17 770	564	94
Nombre de miARN détectés	359	429	260	212	386	397	349	210	548	436	320	204
Les 5 miARN les plus abondants	miR-518e miR-335 miR-302 miR-515 miR-452b	miR-335 miR-26a miR-181d miR-509 miR-524	miR-515 miR-335 miR-509 miR-616 miR-545	miR-335 miR-515 miR-892a miR-873 miR-509	miR-509 miR-181d miR-335 miR-518e miR-515	miR-515 miR-892a miR-518e miR-134 miR-509	miR-335 miR-325 miR-377 miR-586b miR-518e	miR-515 miR-892a miR-223 miR-616 miR-873	miR-335 miR-892a miR-515 miR-545 miR-27ab	miR-518e miR-590 miR-588b miR-873 miR-590	miR-335 miR-515 miR-137 miR-509 miR-590	miR-515 miR-335 miR-892 miR-809 miR-223

**Tableau 2 : Caractérisation des miARN présents dans 12 fluides biologiques. (D'après (Weber et al. 2010)).**

La société Rosetta Genomics propose des tests diagnostiques basés sur l'expression de miARN. Le test *miRview lung* utilise une signature de huit miARN afin de différencier les quatre principales classes de cancer du poumon à partir d'une biopsie avec une précision de 94% (Gilad et al. 2012). En ce qui concerne les miARN circulants, des travaux récents ont identifié un panel de dix miARN capable de prédire le développement d'un cancer du poumon non à petites cellules chez plus de six patients sur sept à partir d'une étude rétrospective, 33 mois avant que le diagnostic officiel ne soit établi (Chen et al. 2012).

Dans le contexte de la mucoviscidose, une étude récente a eu pour but d'identifier la signature des miARN circulants chez des enfants CF présentant un risque de développer une CFLD (*cystic fibrosis liver disease*). Les auteurs ont étudié l'expression des miARN dans trois groupes d'enfants : des enfants atteints de mucoviscidose et de CFLD, des enfants atteints de mucoviscidose sans CFLD et des enfants non malades. L'expression des miARN a été étudiée par PCR *array* puis validée par RT-qPCR. Les auteurs ont identifié une combinaison de trois miARN (miR-122, miR-21 et miR-25) qui permet de discriminer les groupes CF avec ou sans CFLD avec une spécificité de 94% et une sensibilité de 47% (Cook et al. 2015). Ce test rapide et non invasif permettrait le diagnostic précoce de la CFLD et donc la mise en place de traitements appropriés mais des études complémentaires sont encore nécessaires.

### 3.3.2. MicroARN et thérapeutiques

Les miARN sont aujourd'hui des cibles thérapeutiques, il existe en effet de nombreux programmes qui visent à développer des thérapies basées sur les miARN. Le plus avancé de ces programmes cible le miR-122, spécifique du foie, en utilisant un anti-miR-122 : le miravirsén. Le miravirsén est actuellement en essai clinique pour le traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C.

Il existe deux approches pour développer des thérapies basées sur les miARN : les antagonistes de miARN ou les mimics de miARN. Les antagonistes de miARN sont utilisés pour inhiber des miARN endogènes qui montrent un gain de fonction dans des tissus malades. Ce genre de thérapie est similaire à l'utilisation de siARN. L'antagomiR (ou antimir) va se fixer avec une très forte affinité au miARN mature, le duplex va alors être dégradé. Un

des problèmes majeurs de ce genre de thérapie est qu'un miARN régule plusieurs gènes, l'inhibition du miARN non spécifique à un gène particulier peut résulter en de nombreux effets secondaires néfastes. Les mimics de miARN sont utilisés pour restaurer une perte de fonction, cette approche dite « thérapie de remplacement de miARN » vise à réintroduire des miARN dont l'expression est diminuée dans des cellules malades. Dans de nombreux cas, cette réintroduction de miARN mène à une réactivation de voies de signalisation requises dans des cellules saines. La preuve de concept de cette thérapie de remplacement de miARN a été démontrée avec l'utilisation de miARN suppresseurs de tumeur qui stimulent des voies de signalisation anti-oncogéniques et qui mènent à l'éradication des cellules tumorales (Takeshita et al. 2010, Wiggins et al. 2010). Des mimics de let-7 et miR-34 sont actuellement en phase de développement pré-clinique pour cibler un large spectre de tumeurs. Une cible clé réprimée par let-7 est KRAS, un oncogène fréquemment muté dans le cancer du poumon et d'autres cancers. L'injection de mimic de let-7 mène à une inhibition de la croissance tumorale chez des souris transgéniques KRAS-G12D (Trang et al. 2010).

Le miR-122 est un miARN spécifique du foie qui se lie au 5'UTR de l'ARNm du virus de l'hépatite C et qui permet la stabilité et l'accumulation de ce dernier. Des tests avec un antagomiR du miR-122 conjugué au cholestérol ont été réalisés chez des souris et ont montré des résultats probants avec une diminution de l'expression du miR-122 et des taux de cholestérol plasmatique. Une nouvelle molécule séquestrant spécifiquement le miR-122 a été développée, cette molécule porte le nom de miravirsén ou SPC3649. Le miravirsén possède l'avantage d'être couplé à une base *locked nucleic acid* (LNA) et d'avoir des liaisons phosphorothioates. La base LNA est un analogue d'acide nucléique dans lequel l'anneau de ribose est chimiquement modifié avec introduction d'un pont méthylène. Ces modifications chimiques permettent d'apporter à la molécule une grande stabilité thermodynamique et d'empêcher sa dégradation par les nucléases (Lindow and Kauppinen 2012). Après avoir été testé chez des souris et des singes verts africains (Elmen et al. 2008), le miravirsén a été testé chez des chimpanzés infectés de manière chronique par le HCV. Les chimpanzés ont reçu le miravirsén en intraveineuse une fois par semaine pendant 12 semaines suivies d'une période de 17 semaines sans traitement. Le miravirsén séquestrant spécifiquement le miR-122, le traitement mène à une diminution prolongée de la réplication du HCV sans

preuve de résistance virale ou d'effets secondaires chez les animaux traités. De plus, il est important de noter que le miravirsén est détecté par northern-blot jusqu'à huit semaines après la dernière dose injectée (Lanford et al. 2010). En 2011-2012, une étude de phase IIa a été effectuée chez des patients atteints d'hépatite C chronique qui ont reçu cinq injections sous-cutanées par semaine de miravirsén pendant une période de 29 jours. Cette étude clinique a montré une diminution prolongée et dose-dépendante des niveaux d'ARN du HCV, de la cholestérolémie et une modification de l'expression d'une centaine de gènes dans le foie (Janssen et al. 2013). Les niveaux d'ARN du HCV sont devenus indétectables chez cinq patients mais les niveaux d'expression du virus ont rebondi chez certains patients (van der Ree et al. 2014). La variabilité de réponses au miravirsén observées chez les patients suggère que des facteurs viraux et/ou des facteurs de l'hôte peuvent influencer la réponse au traitement. Un certain nombre de questions restent donc en suspens : combien de copies de miR-122 sont requises pour la réplication du HCV ? Comment le miravirsén est-il capable de séquestrer tous les miR-122 hépatiques ? Combien de temps l'inhibition du miR-122 par le miravirsén est-elle préservée ? Une nouvelle étude clinique a donc été réalisée dont les objectifs étaient d'évaluer les changements plasmatiques du niveau d'expression du miR-122 chez des patients atteints d'hépatite C chronique avant, pendant et après traitement par le miravirsén. Les patients reçoivent des injections sous-cutanées de miravirsén cinq fois par semaine pendant 29 jours (van der Ree et al. 2016). Les auteurs ont montré une diminution significative et prolongée du niveau d'expression du miR-122 dans le plasma des patients traités par le miravirsén. Les niveaux d'expression plasmatique d'autres miARN ont également été évalués et il a été montré qu'ils sont variables chez tous les patients et indépendants du traitement par le miravirsén. Les auteurs ont mis en évidence que la diminution plasmatique du niveau d'expression du miR-122 n'est pas toujours accompagnée d'une diminution de la charge virale et qu'il n'y a pas de corrélation entre les niveaux d'expression du miR-122 et de l'HCV (van der Ree et al. 2016). Récemment, il a été montré qu'il existait un changement de nucléotide C3U en 5'UTR de l'ARNm de l'HCV chez les patients présentant une rechute du virus (Ottosen et al. 2015). Le mutant C3U est insensible au miravirsén, les auteurs ont émis l'hypothèse que ce mutant rend le virus indépendant au miR-122 et utilise un mécanisme alternatif pour stabiliser et répliquer le virus. Les auteurs ont de plus montré que la diminution plasmatique du miR-122 était toujours observée deux

mois après la dernière injection de miravirsén, ce qui peut être expliqué par la longue demi-vie du miravirsén dans les tissus (environ 30 jours) (van der Ree et al. 2016).

D'autres thérapies utilisant des antagomiRs sont en cours de développement. Le miR-208 est un miARN exprimé dans le cœur et qui stimule l'hypertrophie des cardiomyocytes et la fibrose en réponse au stress et à un hypothyroïdisme. Des souris KO pour miR-208 sont résistantes à l'induction de l'hypertrophie des cardiomyocytes et de la fibrose en réponse à ces stimuli suggérant qu'une approche antagoniste pour le miR-208 améliorerait la maladie cardiaque chronique.

La mucoviscidose est une pathologie mortelle liée à la déficience du canal chlorure CFTR et pour laquelle les stratégies thérapeutiques spécifiques restent limitées. Depuis quelques années, le canal ANO1 est proposé comme cible thérapeutique potentielle pour pallier la déficience d'efflux chlorures chez les patients CF sans qu'une molécule efficace ciblant directement ANO1 ne soit proposée. De plus, des travaux précédents de notre laboratoire ont montré la dérégulation d'ANO1 dans le contexte CF. Les miARN sont des régulateurs de l'expression des gènes et aujourd'hui de nouvelles cibles thérapeutiques. Les travaux de ma thèse ont donc porté sur la régulation du canal chlorure ANO1 par les miARN.

# **Objectifs du travail**

L'atteinte pulmonaire représente aujourd'hui la première cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose (patients CF). La mutation du gène *CFTR* induit un défaut de sécrétion de Cl<sup>-</sup> au niveau de l'épithélium des voies aériennes perturbant l'hydratation du mucus qui le recouvre et le protège, entraînant à long terme des cycles d'infection et d'inflammation chroniques aboutissant à la dégradation de l'épithélium pulmonaire et finalement au déclin de la fonction respiratoire chez les patients.

Une des stratégies thérapeutiques proposées pour compenser la déficience de CFTR consiste à activer une voie alternative de sécrétion d'ions Cl<sup>-</sup> *via* les canaux chlorures calcium dépendant (CaCC). L'identification en 2008 de la protéine ANO1 comme CaCC par trois équipes distinctes a permis de proposer ce canal comme potentielle cible thérapeutique dans la mucoviscidose. ANO1 possède l'avantage, en plus d'être un canal chlorure qui co-localise avec CFTR, d'être impliqué dans différents processus tels que la migration, la prolifération, l'inflammation, la sécrétion de bicarbonates et de mucus qui sont des paramètres dérégulés dans le contexte de la mucoviscidose. De plus, cibler ANO1 permettrait de s'affranchir du problème des différents types de mutation de *CFTR*. Des travaux précédents de notre laboratoire ont démontré une diminution d'expression et d'activité d'ANO1 dans le contexte CF par rapport au contexte non CF.

**L'objectif de ce travail était d'étudier la régulation d'ANO1 par les microARN (miARN).**

Nous avons donc, dans un premier temps, effectué des analyses bio-informatiques à l'aide de différentes bases de données pour identifier les miARN susceptibles de cibler ANO1. Nous avons ensuite quantifié l'expression d'un miARN cible, miR-9, dans des cellules épithéliales bronchiques CF et non CF pour voir s'il existait une corrélation inverse avec la diminution d'expression d'ANO1 observée précédemment dans les cellules CF. Puis, nous avons cherché à savoir si miR-9 régulait ANO1 et jouait sur son expression, son activité chlorure et la migration cellulaire en surexprimant l'expression de miR-9. Enfin, nous avons synthétisé une molécule qui empêche la fixation de miR-9 à ANO1 et nous avons comparé l'expression et l'activité de canal chlorure d'ANO1 ainsi que la migration cellulaire dans différents modèles pulmonaires CF transfectés avec notre molécule par rapport à leurs contrôles respectifs.

L'ensemble des résultats de cette étude permet d'apprécier la pertinence d'ANO1 en tant que cible thérapeutique dans la mucoviscidose et de proposer une stratégie innovante.

# Résultats

# 1. Article

Cet article a été soumis à la revue « *Nature Communications* ».

## 1.1. Contexte de l'étude

L'atteinte pulmonaire est la première cause de morbidité et de mortalité des patients atteints de mucoviscidose. La déficience de CFTR entraîne une déshydratation du liquide de surface des voies aériennes, une altération de la clairance mucociliaire, des cycles d'infection et d'inflammation chroniques menant à long terme à la dégradation de l'épithélium pulmonaire et à l'insuffisance respiratoire chez les patients CF. Une stratégie thérapeutique proposée dans la littérature serait de stimuler une voie alternative d'ions chlorures. La découverte de l'existence des CaCC dans les années 80 en font des candidats idéaux mais l'identification de la protéine ANO1 comme responsable d'une partie de ces efflux chlorures au niveau des voies aériennes n'a eu lieu qu'en 2008. Le canal ANO1 a alors été proposé comme cible thérapeutique dans la mucoviscidose par plusieurs équipes (Becq et al. 2011, Sondo et al. 2014). ANO1 étant indépendant de CFTR, cibler ANO1 pourrait concerner l'ensemble des patients CF. En plus d'être impliqué dans la sécrétion chlorure, ANO1 joue un rôle dans la sécrétion de bicarbonates et mucus. Des travaux précédents de notre laboratoire ont montré que l'activité chlorure d'ANO1 et son activité étaient diminuées dans des cellules épithéliales bronchiques CF par rapport à des cellules non CF. Il a de plus été démontré qu'ANO1 était impliqué dans les processus de prolifération et migration cellulaire et pourrait donc participer à la régulation de l'épithélium pulmonaire (Ruffin et al. 2013). Ces résultats nous ont conduits à étudier la régulation du canal ANO1 afin de comprendre l'origine de la dérégulation de son expression dans le contexte CF. Nous nous sommes alors intéressés aux miARN qui sont de petits ARN simple brin non codant qui régulent négativement l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle.

## 1.2. Résultats

Les analyses bio-informatiques à l'aide de différentes bases de données ont identifié quatre miARN susceptibles de réguler ANO1. Nous avons ensuite poursuivi notre travail sur l'étude de miR-9, nos travaux sur les autres miARN sont détaillés dans la partie « résultats complémentaires ».

Cette étude nous a permis, dans un premier temps, de montrer qu'un miARN, miR-9, était surexprimé dans des cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) par rapport à des cellules non CF (16HBE14o-). Nous avons de plus observé une corrélation inverse significative entre les niveaux d'expression de miR-9 et d'ANO1 dans nos cellules (figure 1 de l'article). Nous avons alors démontré que miR-9 régule ANO1 dans un contexte physiologique (cellules non CF) en surexprimant son expression à l'aide d'un mimic (figure 2 de l'article). Nous avons pu observer une diminution significative de l'expression des transcrits et de la protéine ANO1 par RT-qPCR et western-blot lorsque nous surexprimons miR-9 (figures 2a et 2b de l'article). Nous avons également mis en évidence une diminution significative de la conductance Cl<sup>-</sup> d'ANO1 et de la vitesse de migration cellulaire lorsque miR-9 est surexprimé (figures 2c et 2d de l'article). Nous avons alors voulu savoir si la régulation d'ANO1 par miR-9 est une régulation directe, nous avons donc effectué des tests d'activité luciférase à l'aide d'un plasmide luciférase couplé au 3'UTR d'ANO1 et nous avons observé une diminution significative de l'activité luciférase des cellules lorsque miR-9 est surexprimé par rapport à la condition contrôle. Aucune différence n'est observée lorsque les cellules sont transfectées avec un plasmide luciférase couplé au 3'UTR d'ANO1 muté pour les sites de fixation de miR-9. Nous en avons donc conclu que miR-9 régule directement ANO1 dans les cellules non CF (figure 3a de l'article). Nous nous sommes donc intéressés à la régulation d'ANO1 dans le contexte CF en effectuant la même expérience d'activité luciférase avec cette fois-ci un inhibiteur de miR-9. Nous avons alors observé une augmentation significative de l'activité luciférase des cellules CF lorsque miR-9 est inhibé alors qu'aucune différence n'est observée lorsque le plasmide muté est utilisé : miR-9 régule directement ANO1 dans les cellules CF (figure 3b de l'article).

Dans le contexte CF, il nous est apparu intéressant de pouvoir augmenter l'expression d'ANO1 dans le but d'augmenter son activité chlorure et de proposer une nouvelle stratégie

thérapeutique. Dans une deuxième partie, nous avons donc fait synthétiser une molécule, un *target site blocker* ou TSB ANO1 qui va se fixer au 3'UTR d'ANO1 et empêcher la fixation de miR-9 à ce dernier. Notre TSB est couplé à une base LNA et des groupements phosphorothioates afin d'augmenter son affinité pour ANO1 et d'empêcher sa dégradation par les nucléases présentes dans les fluides biologiques. Nous disposons également de deux molécules LNA contrôles, dont l'une est fluorescente afin de vérifier la bonne transfection des cellules. Nous avons transfecté notre TSB ANO1 dans des lignées de cellules épithéliales bronchiques CF et nous avons observé une augmentation significative de l'expression et des efflux chlorures dépendants d'ANO1 (figures 4a et 4b de l'article). De manière intéressante, les efflux chlorures liés à ANO1 dans les cellules CF transfectées avec le TSB ANO1 sont identiques aux efflux observés dans les cellules non CF (figure 4c de l'article). Nous avons également observé une augmentation significative de la migration cellulaire lorsque les cellules sont transfectées avec le TSB ANO1 (figure 4d de l'article). Nous avons donc voulu confirmer nos résultats sur un modèle de cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide issues de 4 patients CF. Nous avons transfecté ces cultures et nous avons observé une augmentation significative de l'expression protéique d'ANO1, des efflux chlorures liés à ANO1 et de la migration cellulaire (figures 5b, 5c, et 5d de l'article). Nous nous sommes également intéressés à la clairance mucociliaire par l'utilisation de billes fluorescentes, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de celle-ci dans les cultures primaires transfectées avec le TSB ANO1 (figure 5e de l'article).

Dans un dernier temps, nous avons voulu vérifier la régulation d'ANO1 par miR-9 *in vivo* et la possibilité d'utiliser le TSB ANO1 en thérapeutique. Nous avons donc donné le TSB ANO1 par instillation intranasale à des souris CF (homozygotes F508del) une fois par semaine pendant deux semaines puis nous avons sacrifié les souris à la fin de la deuxième semaine (figure 6b de l'article). Nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative des efflux chlorures liés à ANO1 dans la trachée des souris CF auxquelles nous avons instillé le TSB ANO1 (figure 6d de l'article).

### 1.3. Conclusion

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence qu'un miARN, miR-9 est surexprimé dans les cellules CF par rapport aux cellules non CF et que ce miARN régule directement ANO1 dans un contexte physiologique mais également pathologique induisant une diminution d'expression et d'activité d'ANO1 ainsi qu'une diminution de la vitesse de migration des cellules. D'autre part, cette étude suggère que l'utilisation d'un TSB ANO1 spécifique à ANO1 empêchant la fixation de miR-9 à ce dernier, permet d'augmenter l'expression et l'activité chlorure d'ANO1 dans des modèles CF *in vitro* et *in vivo*. Le TSB ANO1 permet également d'augmenter la clairance mucociliaire et la migration cellulaire. En régulant positivement plusieurs paramètres dérégulés dans le contexte CF, cette étude permet donc d'apprécier le TSB ANO1 comme potentielle cible thérapeutique dans la mucoviscidose.

Ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet international par Inserm Transfert le 03 Juillet 2015 (n°PCT/FR2015/051850) et sont actuellement en cours de valorisation par Inserm Transfert et la SATT Lutech. Nous recevons également des conseils de Kurma Partners, un fond d'investissement d'avenir spécialiste du financement de l'innovation en santé, pour établir le programme de maturation de nos travaux. Enfin, nous disposons du soutien du comité stratégique de l'association Vaincre La Mucoviscidose pour la suite de ce projet.

## **MicroRNA-9 downregulates ANO1 chloride channel and participates to cystic fibrosis lung pathology**

Florence Sonneville,<sup>1,2</sup> Manon Ruffin,<sup>1,2</sup> Christelle Coraux,<sup>4</sup> Nathalie Rousselet,<sup>1,2</sup> Philippe le Rouzic,<sup>1,2</sup> Sabine Blouquit-Laye,<sup>5</sup> Harriet Corvol,<sup>1,2,3</sup> Olivier Tabary<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inserm UMR\_S 938, CDR Saint-Antoine, Paris, France

<sup>2</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Paris, France

<sup>3</sup>Hôpital Trousseau, Paediatric Respiratory Department, AP-HP, Paris, France

<sup>4</sup>Inserm UMR-S 903, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, France.

<sup>5</sup>Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, UFR des sciences de la santé, Montigny-Le-Bretonneux, France

**Keywords:** cystic fibrosis, miRNA, airways, inflammation, infection, mucus

**Running title:** miRNAs and Cystic Fibrosis

**Corresponding author:** O Tabary, Inserm UMR\_S 938, CDR Saint-Antoine, Bât. Kourilsky, 34 Rue Crozatier, 75012 Paris, France

Tel.: +33 149 284 623

E-mail: [olivier.tabary@inserm.fr](mailto:olivier.tabary@inserm.fr)

## Abstract

**Cystic fibrosis (CF) results from deficient cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein activity leading to defective epithelial ion transport. Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels (CaCC) mediate physiological functions independently of CFTR. In 2008, anoctamin 1 (ANO1/TMEM16A) was identified as the major CaCC in the airways, particularly in epithelial cells. We recently demonstrated that downregulation of the ANO1 channel in CF patients contributes to disease severity via an unknown mechanism. Here, we analyze the mechanism underlying ANO1 deregulation by miRNA activity. We show that microRNA-9 (miR-9) contributes to CF and downregulates ANO1 by directly targeting its 3'UTR. We present a new therapy based on blockage of miR-9 binding to the 3'UTR by using a microRNA target site blocker (TSB) to increase ANO1 activity and thus compensate the CFTR deficiency. The TSB was tested in *in vitro* and *in vivo* CF models and holds great promise as an alternative strategy to treat CF.**

Cystic fibrosis (CF) affects multiple organs, but morbidity and death in CF patients are caused mainly by chronic bacterial lung infection and inflammation leading to progressive lung damage<sup>1</sup>. CF is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene that encodes a chloride channel<sup>2</sup>. The CFTR protein localizes to the apical membrane of epithelial cells and participates in fluid and electrolyte homeostasis<sup>2</sup>.

While current therapies are mainly symptomatic, various drugs targeting the CFTR protein itself have been recently developed<sup>3</sup>. However, functional CFTR rescue remains limited and the effects are mutation-dependent<sup>4,5</sup>. Therefore, to compensate for the CFTR deficiency, alternative strategies have been suggested, such as the stimulation of calcium-activated chloride channels (CaCCs); however, the identity of these chloride channels has remained elusive for over 20 years<sup>6</sup>. In 2008, three research teams independently identified anoctamin 1 (ANO1) or transmembrane protein 16a (TMEM16A) as a CaCC, which they proposed as a potential CF therapeutic target<sup>7-9</sup>. Interestingly, ANO1 shows the same expression pattern as CFTR at the apical membrane of epithelial cells. Moreover, ANO1 is involved in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> permeability, proliferation, wound healing, and cell migration, which are deregulated in CF<sup>10,11</sup>. We recently showed that ANO1 expression and activity are decreased in CF patients<sup>12</sup>. In the current study, we explored the mechanisms involved in the downregulation of ANO1 with the aim to enhance its expression and function as an alternative therapeutic strategy for CF.

MicroRNAs (miRNAs) are evolutionarily conserved non-coding RNAs that negatively regulate gene expression by repressing translation or decreasing mRNA stability. Only few groups have studied the role of miRNAs in CF, and they mainly explored the relationship between CFTR and miRNA expression<sup>13</sup>. Therefore, we investigated the role of miRNAs, especially, miR-9, on ANO1 expression in bronchial epithelial cell lines and primary highly differentiated cells cultured in an air-liquid interface and we propose an alternative strategy to correct chloride efflux in CF patients.

## RESULTS

### Upregulation of miR-9 correlates with downregulation of ANO1 in human bronchial epithelial cell lines

We previously showed that ANO1 expression and activity were decreased in CF, but the mechanisms involved remained unknown<sup>12</sup>. To predict ANO1-targeting miRNAs involved in these decreases, we used several computational tools, including Targetscan, miRDB, miRANDA, and Pictar. Four miRNAs were predicted to target ANO1: miR-9, miR-19a, miR-19b, and miR-144. After preliminary luciferase assays to test the binding of these miRNAs to the ANO1 3'UTR, we focused on miR-9 (see Supplementary Figs. 10–15 for results on the other miRNAs). miR-9 expression was studied in CF (CFBE41o-) and non-CF (16HBE14o-) bronchial epithelial cells by qRT-PCR and showed a 2.5-fold increase in CF cells compared to that in non-CF cells (Fig. 1a). In contrast, ANO1 expression was decreased by 80% in CF cells (Fig. 1b). Interestingly, ANO1 and miR-9 transcript levels were significantly inversely correlated in our models of cell lines ( $P = 0.012$ ; Pearson's correlation) (Fig. 1c).

### miR-9 regulates ANO1 expression and activity, and bronchial epithelial cell migration

The increase in miR-9 expression in CF cells led us to hypothesize that ANO1 is a direct target of miR-9. We transfected non-CF cells (16HBE14o-) with a mimic of miR-9 and verified the transfection efficiency by qRT-PCR and by using a SmartFlare probe (Supplementary Figs. 1 and 2). Additionally, we confirmed the specificity of the miR-9 mimic by quantifying the expression of other miRNAs (including miR-19a) by qRT-PCR (Supplementary Fig. 3). Then, we assessed the effects of miR-9 overexpression on ANO1 mRNA and protein expression. Non-CF cells were transfected with a miR-9 mimic or a negative control. miR-9 overexpression significantly decreased ANO1 mRNA expression by 60% on average (Fig. 2a). Western blotting and immunocytochemistry indicated that the ANO1 protein level significantly decreased after transfection of the cells with a miR-9 mimic (Fig. 2b and Supplementary Fig. 4). Thus, we concluded that miR-9 negatively regulates ANO1 expression in our model of non-CF human bronchial epithelial cell line.

Next, we evaluated the effect of miR-9 on ANO1 channel activity. Figure 2c shows that miR-9 overexpression led to a significant decrease in ANO1 channel activity. Because we had previously demonstrated that ANO1 is involved in cell migration<sup>12</sup>, we studied the effect of miR-9 overexpression on cell migration. We observed a 30% decrease in the migration rate of non-CF cells transfected with a miR-9 mimic compared to that of the negative control-transfected cells (Fig. 2d). These results showed that miR-9 regulates ANO1 chloride activity and cell migration in non-CF human bronchial epithelial cells.

### miR-9 directly regulates ANO1 in bronchial epithelial cells

To test whether miR-9 represses ANO1 expression by binding to the ANO1 3'UTR, 16HBE14o- cells were cotransfected with a miR-9 mimic and a luciferase reporter vector containing WT ANO1 3'UTR (WT-ANO1 3'UTR) or a negative control reporter harboring mutations in the predicted miR-9-binding sites (mut-ANO1 3'UTR). Cotransfection with miR-9 mimic resulted in a 40% reduction of luciferase gene expression from WT-ANO1 3'UTR as compared to mut-

ANO1 3'UTR demonstrating direct miR-9-ANO1 interaction in non-CF cells (Fig. 3a). When the same experiment was conducted in CFBE41o- CF cells using an inhibitor of miR-9, we observed a significant increase in luciferase activity in cells transfected with the inhibitor of miR-9 as compared to those transfected with the control, whereas no significant difference was observed with cells harboring the mutated plasmid (Fig. 3b). We concluded that miR-9 directly regulates ANO1 in CF cells.

### **Specific microRNA target site blocker (TSB) increases ANO1 expression, chloride channel activity, and migration of human bronchial epithelial CF cells**

In the context of CF, the goal would be to increase ANO1 expression to enhance ANO1 chloride channel activity. As miR-9 has multiple targets and miR-9 inhibitors are not specific to ANO1, inhibitors cannot be utilized. Thus, we designed a specific target site blocker (TSB) that binds to the ANO1 3'UTR (ANO1 TSB) to prevent miR-9 binding. The TSB combines different technologies (locked nucleic acid [LNA] and phosphorothioates), allowing enhanced stability, cell permeability, and specificity. We transfected CF cells with either miRCURY LNA negative control (TSB control) or ANO1 TSB for 24 h and then quantified ANO1 protein. ANO1 protein expression was increased 2.5-fold ( $P < 0.05$ ) in the cells transfected with ANO1 TSB (Fig. 4a). By using microinjection of a fluorescent reporter in association with microscopy, we can observe a single cell microinjected with the TSB control and another cell microinjected with ANO1 TSB within the same field (Supplementary videos 1 & 2; Supplementary Figs. 5 & 6). The results revealed a remarkably larger chloride efflux in the ANO1 TSB-transfected cells indicating increased ANO1 channel activity (Fig. 4b). In a more classical approach, we quantified ANO1 channel activity using the Premo Halide sensor method and observed a remarkable increase in ANO1 channel activity in the cells transfected with ANO1 TSB ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4c). Interestingly, in cells transfected with ANO1 TSB, the ANO1 channel activity was similar to that observed in non-CF cells. Finally, the cell migration rate in cells transfected with ANO1 TSB was significantly higher than that in TSB control cells. Together, these results indicated that ANO1 TSB could specifically target ANO1 and modulate its channel activity and role in cell migration.

### **Specific TSB increases ANO1 expression, chloride activity, and migration of primary human bronchial epithelial CF cells**

To mimic *in vivo* epithelium, we used primary human bronchial epithelial cells (hAECB) isolated from bronchial biopsies from CF (F508del/F508del) patients and fully differentiated human bronchial air-liquid interface (ALI) cultures of these cells. We successfully transfected the cells by adding medium containing ANO1 TSB or TSB control to the apical face of ALI cultures, without the use of any transfection reagent (Fig. 5a). After a 2-h incubation at 37 °C, the medium was removed from the apical face to restore the ALI conditions. Freshly prepared control oligonucleotides or ANO1 TSB were added on three consecutive days, and the effects of the transfection were observed 24 h post-treatment. Western blot results showed a significant 68% increase in ANO1 expression in ANO1 TSB-transfected cells as compared to the control (Fig. 5b), while the chloride channel activity was increased 1.7-fold

in these cells (Fig. 5c). Further, we noted a 2.2-fold increase in the migration rate of primary CF cells transfected with ANO1 TSB (Fig. 5d). Additionally, we studied the ciliary beat frequency using fluorescent beads. Interestingly, the average speed of movement of the beads on ANO1 TSB -expressing cells was higher than that on TSB control-treated cells. Thus, the utilization of ANO1 TSB in primary CF cells allowed improving the chloride activity, migration rate, and ciliary beat frequency of the cells, suggesting that ANO1 TSB has therapeutic potential.

### **Specific TSB increases ANO1 chloride activity in mouse lung epithelial cells and in trachea of CF mice**

As the miR-9 sequence and the miR-9 seed sequence in the 3'UTR of ANO1 are very well conserved (Supplementary Figs. 7 and 8), we performed experiments in immortalized mouse lung epithelial cells (MLE-15). For TSB control and ANO1 TSB transfections, we used the same protocol as for the human cell lines, and we quantified ANO1 channel activity as previously described<sup>12</sup>. *In vitro*, MLE-15 cells treated with ANO1 TSB exhibited a strong (3-fold) increase in channel activity (Fig. 6a). Because of the promising results *in vitro*, we next evaluated the effects of ANO1 TSB in CF mice. To determine the potency and efficacy of ANO1 TSB *in vivo*, male CF (CFTR[tm1Eur]) mice received control or ANO1 TSB via intranasal instillation at a previously reported effective dose<sup>14</sup> (Fig. 6b). The mice were treated once every week and were sacrificed on day 21 (Fig. 6b). Weight gains were recorded to estimate any toxic effects of the intranasal instillation and/or TSB. No weight losses were observed after intranasal instillation of ANO1 TSB or control, suggesting that the TSB is well tolerated by the mice (Fig. 6c). Upon sacrifice of the mice, the tracheas were collected for channel activity experiments (Fig. 6d). The chloride efflux was significantly increased (38%) in CF mice treated with ANO1 TSB as compared to CF control mice or WT mice. Therefore, we propose TSB as a candidate drug.

## **DISCUSSION**

In this study, we demonstrated that miR-9 was overexpressed in CF bronchial epithelial cells, and that it directly regulated ANO1, a calcium-activated chloride channel. In addition, we developed an ANO1 TSB that specifically prevents binding of miR-9 to the 3'UTR of ANO1 mRNA, which we previously showed to be decreased in CF<sup>12</sup>. We were able to increase ANO1 expression and chloride activity in *in vitro* as well as *in vivo* CF models (cell lines, primary cells, and mice) to a level similar to that in the corresponding non-CF models. Our results provide evidence that this approach can be considered an interesting therapeutic approach in CF.

To identify ANO1 targets, we first analyzed miRNA–target interactions predicted by various computational algorithms and focused on their intersections. Of the four miRNAs identified, miR-19a and miR-19b did not regulate ANO1, while miR-144 regulated ANO1 only indirectly as indicated by preliminary experiments (Supplementary Figs. 10–15). In addition, miR-9 and ANO1 levels of expression were inversely correlated. We validated ANO1 as a target of miR-9 using luciferase assays to demonstrate that the decreased ANO1 expression

in CF cells was caused by miR-9-mediated ANO1 repression. However, the mechanisms underlying miR-9 deregulation in CF remain currently unknown.

ANO1 has been considered a potential therapeutic target in CF since its discovery in 2008<sup>9</sup>. Indeed, CF is caused by a deficiency in CFTR, which, like ANO1, is a chloride channel expressed throughout the body. Moreover, we and others have previously shown that, similar to CFTR, ANO1 is involved in other pathways deregulated in CF, such as HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion, cell migration, and proliferation<sup>12,15</sup>. Thus, targeting of this channel would be a promising therapeutic strategy for all CF patients, independently of *CFTR* mutations, unlike the current therapies<sup>3</sup>. Targeting of chloride efflux as a therapeutic strategy in CF has been attempted in the nineties by using uridine-5'-triphosphate (UTP) and analogs, which were shown to be able to stimulate chloride secretion in CF respiratory epithelium<sup>16</sup>. UTP activates a signal by binding to a purinergic receptor to release intracellular calcium and activate undefined CaCCs<sup>17</sup>. *In vitro*, UTP could restore liquid transport, enhance tracheal mucus viscosity and ciliary beat frequency, inhibit sodium absorption, and increase airway hydration<sup>18,19</sup>. These promising results led to the development of two drugs, INS365 and INS37217 (later named Denufosal<sup>®</sup>; Inspire Pharmaceuticals) that were more resistant to enzymatic degradation than UTP<sup>20</sup>. Denufosal was carried into clinical trials using nebulization for delivery into the airways. After promising results were obtained in the first clinical trials, an international phase 3 clinical trial was conducted in 466 CF patients<sup>21</sup>. Unfortunately, this trial failed to demonstrate any therapeutic benefit and various hypotheses were raised to explain this outcome. First, the molecular identity of the CaCC was discovered after the phase 3 trial, and the exact effects of Denufosal were only empiric and very transient<sup>22</sup>. It is indeed well known that administration of UTP to the apical surface of the epithelium leads to its binding to the P2Y2 receptor and causes a rapid increase in the cytosolic free calcium concentration associated with a temporary rise in chloride efflux that lasts only a few minutes<sup>23</sup>. Second, the stability of this drug in the context of CF remained problematic, with a very short half-life ranging from 3 h in the nasal epithelium and 17 min in CF lungs to 30 s in the blood because of natural nucleosidases<sup>20,24</sup>. Third, the key selection criteria for young CF patients (mean age, 14.2 years) with only mild or no appreciable baseline impairment of FEV<sub>1</sub> (mean, 92% of predicted) for drug efficacy validation could be discussed. Multiple drugs have indeed demonstrated clinical beneficial endpoints for patients besides FEV<sub>1</sub><sup>25,26</sup>. Finally, while targeting CaCC holds promise, clinical benefits have not yet been achieved; for this reason, we focused on a more objective drug approach by specifically targeting ANO1 in the current study.

Based on knowledge of molecular biology, we developed a specific strategy to increase the expression of a particular target protein by using miRNA. The challenge was to create a very specific molecule, able to induce a strong ANO1 activity, even in a complex system such as CF. To develop a method more accurate than antagomiR- or RNA sponge-based approaches, which silence miRNA and thus affect all miRNA targets, we used a TSB to block the target site(s) of miRNA(s) in the 3'UTR of ANO1<sup>13</sup>. We used a new RNA-based approach combining different technologies (LNA and phosphorothioates) to enhance stability, cell permeability, and specificity of the RNA tool. Another valuable addition to the miRNA tool by the LNA, a bicyclic high-affinity RNA analog in which the ribose ring is chemically locked in an N-type (C3'-endo) conformation, is that it provides the LNA-modified oligonucleotides with high thermal stability during mRNA target hybridization<sup>27,28</sup>. We

studied ANO1 regulation by miR-9 in CF cell lines and primary cultures obtained from patients homozygous for CFTR-F508del, the most frequent *CFTR* mutation worldwide. In these cells, by using ANO1 TSB, we succeeded in increasing ANO1 expression and channel activity as well as cell migration. Importantly, given the importance of cellular migration in the epithelial repair process, this drug might be able to also enhance bronchial epithelial repair in CF. The therapeutic strategy proposed herein and its mode of action are highly innovative in comparison to other therapies proposed to date. Our approach is independent of the *CFTR* gene mutations, providing comparative advantage over the recently developed *CFTR* protein-targeted therapies. Indeed, more than 2,000 *CFTR* gene mutations have been described to date (<http://www.cftr2.org>); thus, developing a drug that would benefit all patients remains a great challenge<sup>3</sup>. Other challenges, including drug degradation as mentioned above, are at least as important in the context of CF. Artificial miRNA target-site drugs are emerging, and the most promising LNA-based drug currently available is Miravirsen<sup>®</sup>, an inhibitor of miR-122 currently in clinical trials for the treatment of hepatitis C viral infections<sup>29</sup>. The effects of Miravirsen have been tested in chimpanzees; the LNA-modified anti-miRNA was shown to be accurate, non-toxic, and very stable—the drug could still be detected 8 weeks after the end of the treatment<sup>30</sup>. Furthermore, the effects of Miravirsen on HCV RNA levels were prolonged at the end of the treatment<sup>31</sup>. The successes obtained with Miravirsen are highly motivating for the translation of our basic research study to future clinical applications.

We demonstrated that our TSB was able to correct the different parameters analyzed in the CF airways, even in a mouse model in which ANO1 expression is predominant, and independently from the *CFTR* channel<sup>32</sup>. In the mouse trachea, the tissue anatomically closest to human bronchi, we observed an activation of the chloride efflux that lasted seven days after the last instillation. The stability and physiological activity of our drug are major advantages in this case. Obviously, the method of administration of the drug into the respiratory tract requires optimization before it can be applied to CF patients.

In conclusion, to our knowledge, the current study is the first to propose a realistic alternative therapy for CF that allows to precisely correct an alternative chloride channel, and the first to report a restoration of the chloride efflux, mucus clearance, and cell migration in a CF context by using a TSB targeting the seed region of miR-9 at the ANO1 3'UTR. Finally, our results highlight that a deep understanding of the pathophysiology is essential to develop innovative therapeutic strategies.

## **ONLINE METHODS**

### **Bioinformatics analysis of miRNA target genes**

The role of miRNAs in the regulation of ANO1 expression was examined using a computational approach, which predicted the 3'UTR of ANO1 mRNA to contain numerous seed regions that are recognized by a variety of miRNAs. The putative miRNAs predicted for ANO1 mRNA were identified and compared using the online target prediction algorithms TargetScan (<http://targetscan.org>), Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de>), miRDB

(<http://mirdb.org/miRDB>), and miRANDA (<http://www.microrna.org>). The NCBI and Ensembl genome browsers (<http://www.ensembl.org/index.html>) provided information on the human ANO1 transcript (NM\_018043; ENST00000355303). The miRBase (<http://www.mirbase.org>) provided information on miR-9 (MI0000466).

## Cell culture

The human bronchial epithelial cell lines 16HBE14o- (non-CF) and CFBE41o- (CF) were kindly provided by Dr. D. C. Gruenert (Institute for Human Genetics, San Francisco, CA, USA) and cultured in MEM containing 10% bovine growth serum and 1% penicillin/streptomycin. Murine lung epithelial cells (MLE-15) were a gift from Dr. Caroline Norez (Poitiers-CNRS university, Poitiers, France). Cells were maintained in HITES (RPMI 1640 with 5  $\mu$ g/mL insulin, 10  $\mu$ g/mL transferrin, 30 nM sodium selenite, 10 nM hydrocortisone, 10 nM  $\beta$ -estradiol, and 10 mM HEPES) supplemented with 4 mM L-glutamine, 10 % fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin G, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. All media and supplements were obtained from Thermo Fischer Scientific (Courtaboeuf, France) unless otherwise indicated. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of air with 5% CO<sub>2</sub>. All cells were test for mycoplasma contamination (Lonza, Ambroise, France).

Primary hAECB isolated from bronchial biopsies from CF (F508del/F508del) patients were purchased from Epithelix SARL (Geneva, Switzerland). The cells fully differentiated in air-liquid interface (ALI) cultures (MucilAir™), were cultured according to the provider's recommendations.

## Cell transfections

Non-CF and CF cells were transfected with a miR-9 mimic (*mirVana*® miRNA mimic), miR-9 inhibitor (*mirVana*® miRNA inhibitor), or negative control (*mirVana*™ miRNA Mimic, Negative Control) (Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France) using HiPerfect (30 nM; Qiagen, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. Forty-eight hours after transfection, the cells were lysed for miRNA, RNA, and protein extractions. CF cells were transfected with LNA-enhanced oligonucleotides targeting the miR-9 target site in the ANO1 3'UTR (ANO1 TSB) or with a miRCURY LNA microRNA inhibitor negative control (TSB control) (Exiqon, Denmark) using Interferin (Polyplus, Ozyme, France). Twenty-four hours after the transfection, the cells were lysed for protein extraction or processed for chloride activity or migration assays. hAECB were transfected by adding medium containing LNA control or ANO1 TSB without any transfection reagent to ALI cells. After a 2-h incubation at 37 °C, the medium was removed to restore the ALI condition. Freshly prepared LNA control or ANO1 TSB were added every day for three days, and ANO1 expression, chloride activity, and migration were assessed 24 h post-treatment.

### **Luciferase assay**

For the luciferase assay, we used an ANO1-3'UTR-pMirTarget luciferase plasmid (Origene Technologies, Rockville, USA) and an ANO1-3'UTR-pMir vector bearing mutations in the miR-9 seed region (MIMAT0000441). CF and non-CF cells were seeded in 24-well plates at  $8 \times 10^4$  cells/well and were transfected the next day with 0.5  $\mu\text{g}$  pMir vector and 0.1  $\mu\text{g}$  *Renilla* luciferase vector using Exgen 500 (Euromedex, France). The cells were cotransfected with 30 nM miR-9 mimic, miR-9 inhibitor, or a negative control (Thermo Fischer Scientific, France). Lysates were prepared 48 h after transfection and assayed for both firefly and *Renilla* luciferase using a luciferase assay system (Promega, France). Firefly luciferase activity was normalized to that of *Renilla* luciferase activity.

### **RNA and miRNA extraction and qRT-PCR analysis**

RNAs and miRNAs were extracted using a Macherey-Nagel kit (Düren, Germany). miR-9 and RNU6B were reverse-transcribed with the TaqMan MicroRNA Assay kit (Thermo Fischer Scientific) using 20 ng miRNA. ANO1 and GAPDH were reverse-transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fischer Scientific) using 1  $\mu\text{g}$  RNA. qPCR was performed using an ABI StepOnePlus (Thermo Fischer Scientific) and TaqMan technology. For relative quantification, the ANO1 mRNA level, calculated using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method, was normalized to the GAPDH mRNA level, and the expression levels of non-CF models and miR-9 were normalized to the RNU6B mRNA level. Each sample was assessed in triplicate.

### **Western blotting**

Total protein extract (20  $\mu\text{g}$ ) was reduced and size-separated on 8% SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), which were blocked in 5% BSA (PAA, Les Mureaux, France). Then, the membranes were incubated with specific primary rabbit polyclonal antibody against ANO1 (ab53213, 1:10) (Abcam, Paris, France) and mouse monoclonal  $\beta$ -actin (A5441, 1:500) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). The proteins of interest were detected, imaged, and quantified as previously described<sup>12</sup>.

### **Migration assays**

Migration assays were performed using specific wound assays chambers (Ibidi®; Biovalley, Marne la Vallée, France) that provide uniform wounds between two monolayers. CFBE410-cells ( $3.5 \times 10^4$ ) were seeded in Ibidi silicone culture-inserts. The cells were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h, the cells were transfected with a miR-9 mimic, negative control (Life Technologies, Saint Aubin, France), or ANO1 TSB/LNA control (Exiqon). The culture inserts were removed after 48 h, leaving a cell-free gap (or wound) for cell colonization. For hAECB, wounds were generated using a tip soaked in liquid nitrogen. Wound closure was observed for 4 h under an Axiovert 200 microscope in a chamber maintained 37 °C with 5%

CO<sub>2</sub>. Mean migration rates during wound closure were assessed in three areas of the gap. At each time point and in each field, five lengths were measured using the AxioVision Rel software (Zeiss, Marly-Le-Roi, France).

### **ANO1 chloride channel activity assay**

ANO1 channel activity was assessed by I<sup>-</sup> quenching of halide-sensitive YFP-H148Q/I152L protein (Thermo Fischer Scientific). The probe was transfected into the cells and after 48 h of culture, conductance was stimulated with UTP (10 μM). I<sup>-</sup> solution (140 mM) was added, and the fluorescence was recorded using a plate reader as previously described<sup>33</sup>. The initial I<sup>-</sup> influx rate upon addition of each solution was computed from changes in YFP fluorescence data using non-linear regression. For quantitative analysis, the slope for fluorescence quenching, which correlates to the level of chloride conductance (I<sup>-</sup> uptake), was determined using linear regression. The rate of change (ΔF/min) was then calculated.

### **Microinjection experiments**

CF cells were seeded on glass-bottom Ibidi dishes 24 h after transfection with the YFP-H148Q/I152L protein construct, and ANO1 TSB or control TSB were microinjected using a Xenowork micromanipulator and digital microinjector (Sutter Instrument, CA, USA). To discriminate the different transfections, ANO1 TSB was microinjected with Dextran Texas Red neutral (Thermo Fischer Scientific). Four hours after microinjection, the cells were injected with I<sup>-</sup> using a microperfusion system (Valvelink; Automate Scientific, CA, USA) and observed under an Axiovert 200 microscope (63× objective lens, Zeiss). The fluorescence was quantified with the ImageJ software (US National Institutes of Health, ML, USA).

### **Mucus clearance assay**

Thirty days after transfection of hAECB cells with ANO1 TSB or control TSB, FluoSpheres Carboxylate-Modified Microspheres, 1.0 μm, yellow-green fluorescent (505/515) (Thermo Fisher Scientific) diluted in culture medium were added to the apical face of the cultures. Movement of the beads was recorded under an Axiovert 200 microscope (Zeiss).

### **Animal experiments**

All experiments were conducted in accordance with our Institutional Animal Care and Use Department (approval 20150511145844v3 of the Ethical Committee for Laboratory Animal Care Charles Darwin France). We used 8-week-old male 129-Cftr<sup>tm1Eur</sup> CF model mice homozygous for the F508del mutation in the 129/FVB outbred background (F508del-CFTR) and their wild-type littermates obtained from CDTA-CNRS (Orléans, France). Animals were maintained in the specific pathogen free mouse facility of Paris 6 with access to food and water *ad libitum*, and their weights were recorded every day. To minimize bowel obstruction, a commercially available osmotic laxative containing polyethylene glycol (PEG-

3350) and electrolytes (Movicol®) was supplied continuously at 6% in the drinking water<sup>34</sup>. Prior to instillation, mice were anesthetized with 2.5% isoflurane delivered in O<sub>2</sub> (2 L/min). Challenge doses of TSB (10 mg/kg; once per week during two weeks) were intranasally administered by pipetting the solution onto the outer edge of each nostril. Seven days after the last challenge, the mice were sacrificed with a lethal dose of CO<sub>2</sub>. After exsanguination, the chest wall was opened and the trachea was isolated. Halide sensor method was performed on a tracheal section and chloride activity was measured as previously described<sup>12</sup>.

## Statistical analysis

Xlstat version 2014 (Paris, France) was used for all analyses. No statistical method was used to predetermine sample size. The sample size was estimated based on a previously published study<sup>12,34</sup>. Animals were randomly assigned to experimental groups. All analyses were performed blinded, and all data are presented as the mean ± SD. Outliers were identified by Grubbs's test (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Statistically significant differences between two groups were determined by two-tailed t-test. An unpaired Student's t-test with Welch's correction was applied when variances were not equal. For three or more groups, statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni, Tukey and Dunnett post-analysis, as appropriate;  $p < 0.05$  was considered statistically. Correlation coefficients were calculated by Pearson's correlation test. In the figures, statistically significant differences with  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*) are indicated.

## References

1. Pittman, J.E. & Ferkol, T.W. The Evolution of Cystic Fibrosis Care. *Chest* **148**, 533-542 (2015).
2. Riordan, J.R., *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [published erratum appears in *Science* 1989 Sep 29;245(4925):1437]. *Science* **245**, 1066-1073 (1989).
3. Corvol, H., Thompson, K.E., Tabary, O., le Rouzic, P. & Guillot, L. Translating the genetics of cystic fibrosis to personalized medicine. *Transl Res* (2015).
4. Van Goor, F., *et al.* Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18825-18830 (2009).
5. Wainwright, C.E., *et al.* Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* (2015).
6. Nilius, B. & Droogmans, G. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand* **177**, 119-147 (2003).
7. Schroeder, B.C., Cheng, T., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* **134**, 1019-1029 (2008).
8. Yang, Y.D., *et al.* TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* **455**, 1210-1215 (2008).
9. Caputo, A., *et al.* TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* **322**, 590-594 (2008).

10. Jia, L., Liu, W., Guan, L., Lu, M. & Wang, K. Inhibition of Calcium-Activated Chloride Channel ANO1/TMEM16A Suppresses Tumor Growth and Invasion in Human Lung Cancer. *PLoS One* **10**, e0136584 (2015).
11. Stanich, J.E., *et al.* Ano1 as a regulator of proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, G1044-1051 (2011).
12. Ruffin, M., *et al.* Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 2340-2351 (2013).
13. Sonnevile, F., *et al.* New Insights about miRNAs in Cystic Fibrosis. *Am J Pathol* (2015).
14. Gupta, N., *et al.* A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression in vitro and in vivo. *PLoS One* **5**, e10682 (2010).
15. Jung, J., *et al.* Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup> permeability by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 360-365 (2013).
16. Knowles, M.R., Clarke, L.L. & Boucher, R.C. Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **325**, 533-538 (1991).
17. Lazarowski, E.R. & Boucher, R.C. Purinergic receptors in airway epithelia. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 262-267 (2009).
18. Kellerman, D., Evans, R., Mathews, D. & Shaffer, C. Inhaled P2Y<sub>2</sub> receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1463-1474 (2002).
19. Kunzelmann, K., *et al.* Purinergic inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> transport via hydrolysis of PIP<sub>2</sub>. *FASEB J* **19**, 142-143 (2005).
20. Yerxa, B.R., *et al.* Pharmacology of INS37217 [P(1)-(uridine 5')-P(4)- (2'-deoxycytidine 5')tetraphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y<sub>2</sub> receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 871-880 (2002).
21. Ratjen, F., *et al.* Long term effects of denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **11**, 539-549 (2012).
22. Moss, R.B. Pitfalls of drug development: lessons learned from trials of denufosal in cystic fibrosis. *J Pediatr* **162**, 676-680 (2013).
23. Galietta, L.J., *et al.* IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium in vitro. *J Immunol* **168**, 839-845 (2002).
24. Kellerman, D., Mills-Wilson, M. & Johnson, C. Pharmacokinetics of INS37217 after inhaled and intravenous administration in healthy volunteers. . in *Pediatr Pulmonol* Vol. 38 (Suppl. 27) 348 (North American cystic fibrosis conference, 2004).
25. Saiman, L., *et al.* Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *Jama* **303**, 1707-1715 (2010).
26. Quan, J.M., *et al.* A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr* **139**, 813-820 (2001).
27. Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C. & Erdmann, V.A. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **30**, 1911-1918 (2002).
28. Lennox, K.A. & Behlke, M.A. A direct comparison of anti-microRNA oligonucleotide potency. *Pharm Res* **27**, 1788-1799 (2010).
29. Lindow, M. & Kauppinen, S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *J Cell Biol* **199**, 407-412 (2012).
30. Hildebrandt-Eriksen, E.S., *et al.* A locked nucleic acid oligonucleotide targeting microRNA 122 is well-tolerated in cynomolgus monkeys. *Nucleic Acid Ther* **22**, 152-161 (2012).
31. Janssen, H.L., *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* **368**, 1685-1694 (2013).

32. Gianotti, A., *et al.* Pharmacological analysis of epithelial chloride secretion mechanisms in adult murine airways. *Eur J Pharmacol* **781**, 100-108 (2016).
33. Saint-Criq, V., *et al.* Azithromycin fails to reduce inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Eur J Pharmacol* **674**, 1-6 (2012).
34. Bonvin, E., *et al.* Congenital tracheal malformation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *J Physiol* **586**, 3231-3243 (2008).

### **Acknowledgments**

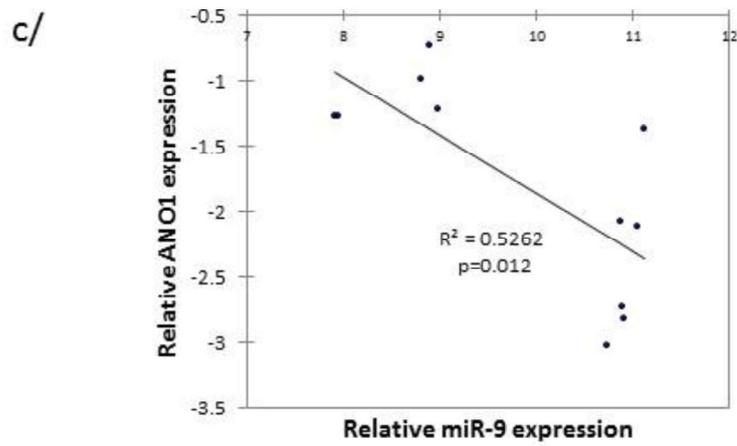
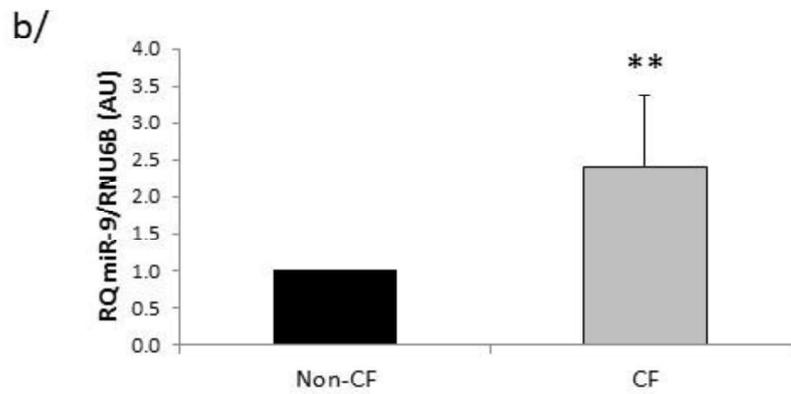
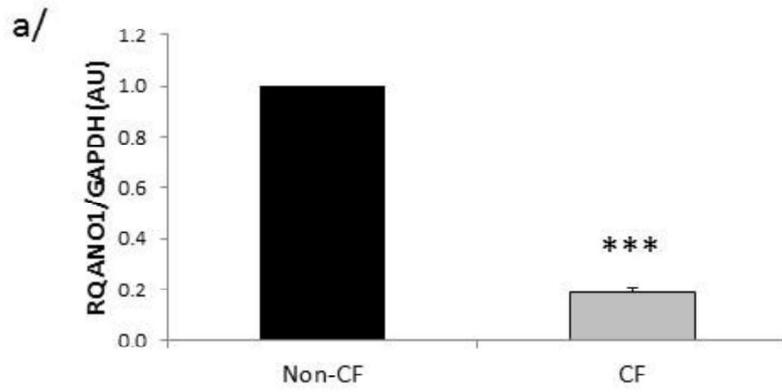
We thank O. Bregerie and coworkers of the Animal Research Facility of the Pitié-Salpêtrière-UPMC Université Paris 06, France. We thank Dr. D.C. Gruenert who provided the 16HBE14o- and CFBE41o- cells and Dr. C. Norez who provided MLE-15 cells This research was funded in part by grants from Inserm, UPMC-Paris 06, the non-profit organization Vaincre la mucoviscidose, and the Legs Poix-Chancellerie des Universités, Paris. F.S. received a PhD grant from Vaincre la mucoviscidose. M.R. received a PhD grant from the Émergence-UPMC 2010 research program.

### **Author contributions**

F.S. performed and designed experiments, interpreted results, and wrote the manuscript. M.R. performed experiments. C.C. provided human ALI culture. N.R. performed experiments. P.L.R. interpreted experiments and wrote the article. S.B.L. provided human ALI culture and performed experiments. H.C. interpreted data and wrote the article. O.T. performed and designed experiments, interpreted results, obtained funding and wrote the manuscript.

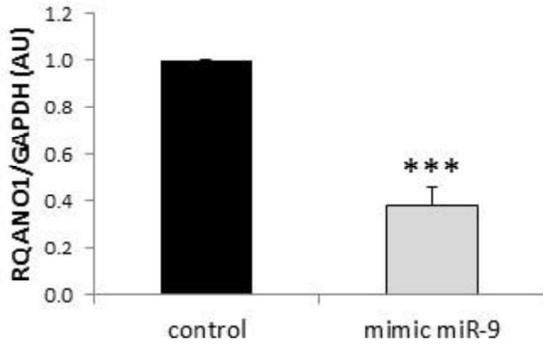
### **Competing financial interests**

F.S. and O.T. own a patent application related to the findings described herein (PCT/FR2015/051850).

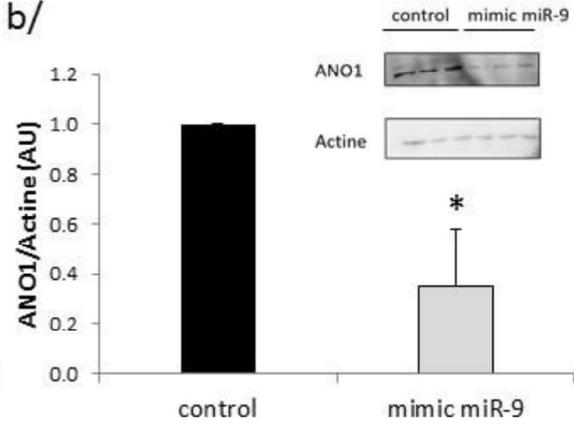


**Figure 1** Downregulation of ANO1 mRNA and upregulation of miR-9 are correlated in human bronchial epithelial cell lines. **(a)** miR-9 expression in non-CF (16HBE14o-;  $n = 5$ ) and CF (CFBE41o-;  $n = 6$ ) bronchial epithelial cell lines measured by qRT-PCR. Relative expression levels were normalized to RNU6B. Data are represented as the mean  $\pm$  SD and were compared using Student's *t*-test. All qRT-PCR experiments were performed in triplicate. **(b)** Relative expression levels of ANO1 mRNA in non-CF (16HBE14o-;  $n = 5$ ) and CF (CFBE41o-;  $n = 6$ ) human bronchial epithelial cells normalized to GAPDH. Data are quantified by qRT-PCR and are represented as a fold-change compared to normalized controls. Data are represented as the mean  $\pm$  SD and were compared using Student's *t*-test. All qRT-PCR experiments were performed in triplicate. **(c)** Pearson's correlation analysis showed a negative correlation between miR-9 and ANO1 mRNA expression levels in non-CF and CF bronchial epithelial cell lines ( $P = 0.012$ ).

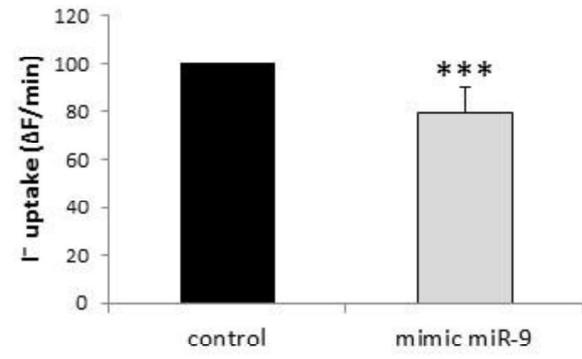
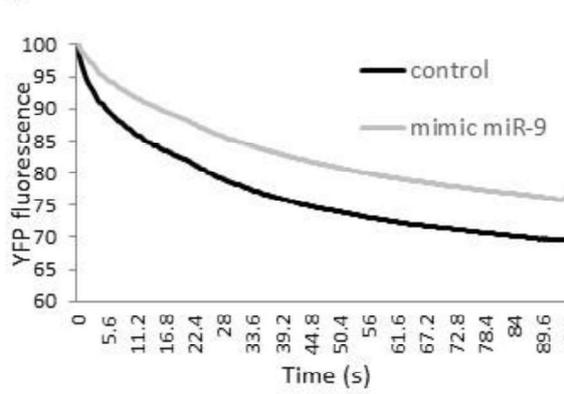
a/



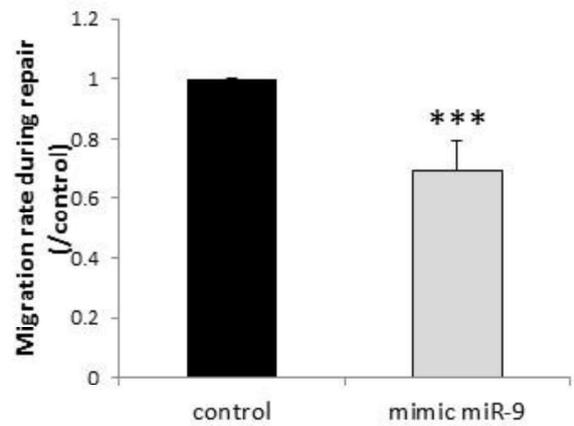
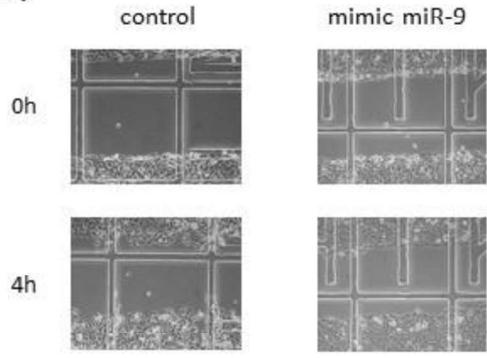
b/



c/

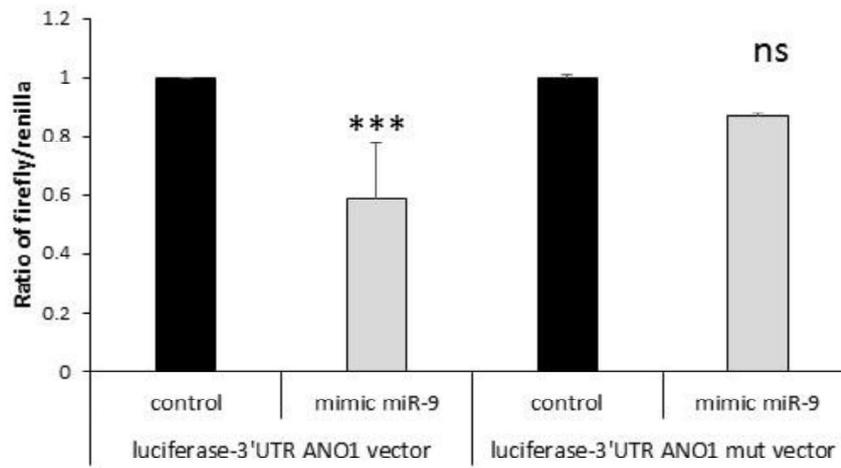


d/

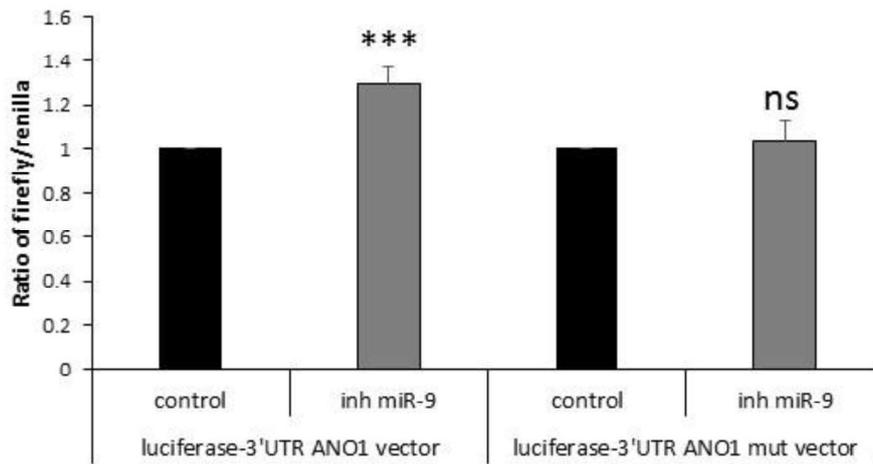


**Figure 2** miR-9 regulates ANO1 expression, ANO1 chloride activity, and migration in non-CF cells. Non-CF cells (16HBE14o-) were transfected with a miR-9 mimic (30 nM) or a negative control for 48 h. (a) ANO1 mRNA expression was analyzed by RT-qPCR and normalized to GAPDH ( $n = 3$ ). Data are represented as the mean  $\pm$  SD and were compared using Student's  $t$ -test. All qRT-PCR experiments were performed in triplicate. (b) ANO1 protein expression was analyzed by western blotting using anti-ANO1 antibody and normalized to  $\beta$ -actin ( $n = 3$  in triplicate). Data are represented as the mean  $\pm$  SD and were compared using Student's  $t$ -test. (c) ANO1 chloride channel activity assessed by  $I^-$  quenching of halide-sensitive YFP-H148q/I152L protein. Representative and original traces of ANO1 chloride activity (left) and quantification (right) of non-CF cells transfected with a miR-9 mimic or negative control ( $n = 8$ , in triplicate). Data are represented as the mean  $\pm$  SD and were compared using Student's  $t$ -test. (d) Representative images taken during 4 h of wound closure of non-CF cells transfected with a miR-9 mimic or a negative control (left) and quantification of the migration rates during repair ( $n = 5$ ). Data are represented as the mean  $\pm$  SD and were compared using Student's  $t$ -test.

a/

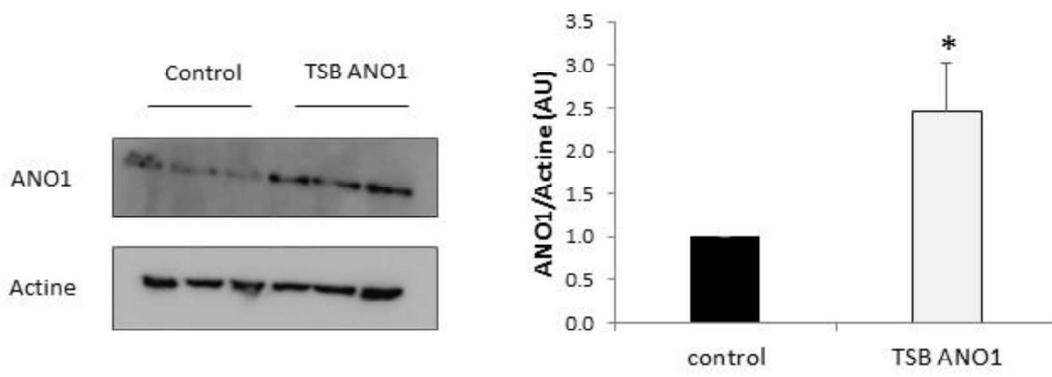


b/

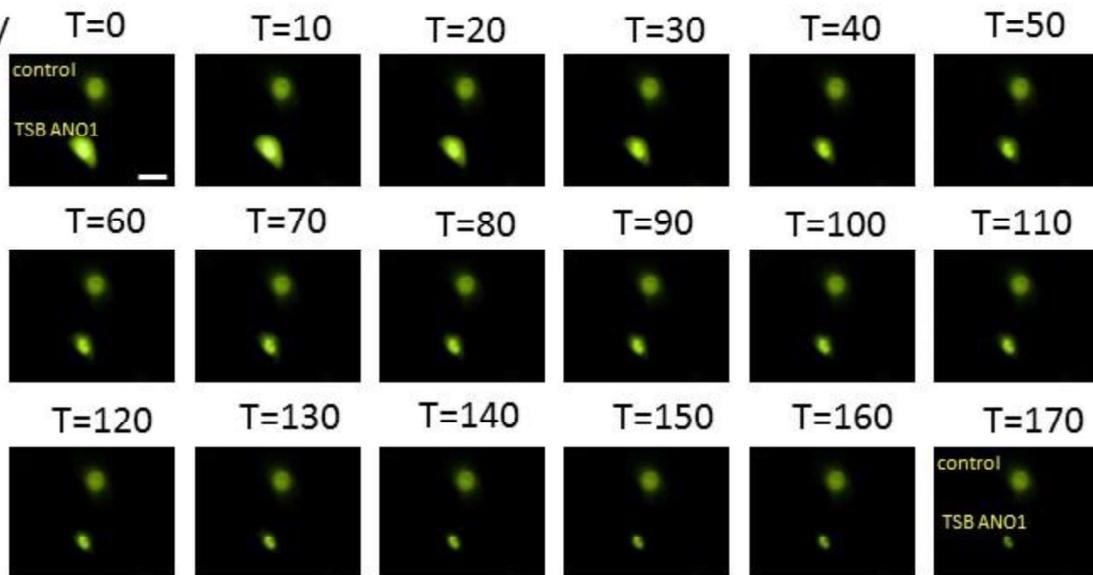


**Figure 3** miR-9 directly targets ANO1 3'UTR in non-CF and CF cells. **(a)** Relative luciferase activity in non-CF cells (16HBE14o-) transiently transfected with a luciferase-3'UTR ANO1 vector or a luciferase-3'UTR ANO1 vector mutated at miR-9 binding sites and co-transfected with a miR-9 mimic or a negative control (control). Firefly luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity ( $n = 3$ , 8 replicates). Histograms represent average values  $\pm$  SDs and were compared using Student's *t*-test. **(b)** Relative luciferase activity in CF cells (CFBE41o-) transiently transfected with luciferase-3'UTR ANO1 or luciferase-3'UTR ANO1 mutated at miR-9 binding sites and cotransfected with an inhibitor of miR-9 (inh miR-9) or a negative control (control). Firefly luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity ( $n = 3$  with 8 replicates). Histograms represent average values  $\pm$  SDs and were compared using Student's *t*-test.

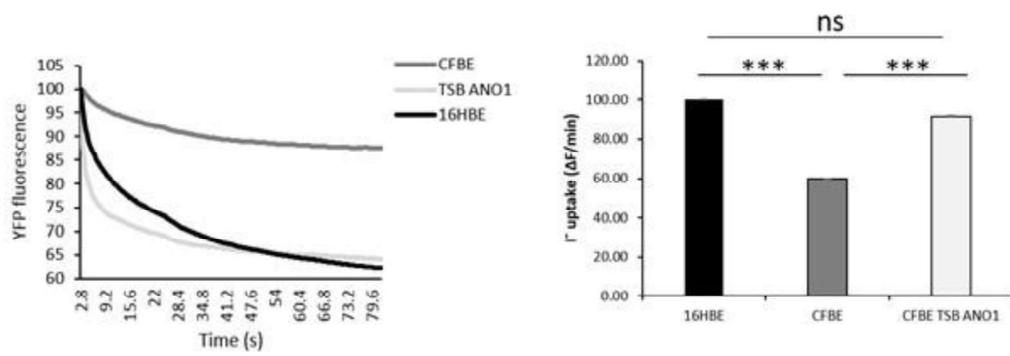
a/

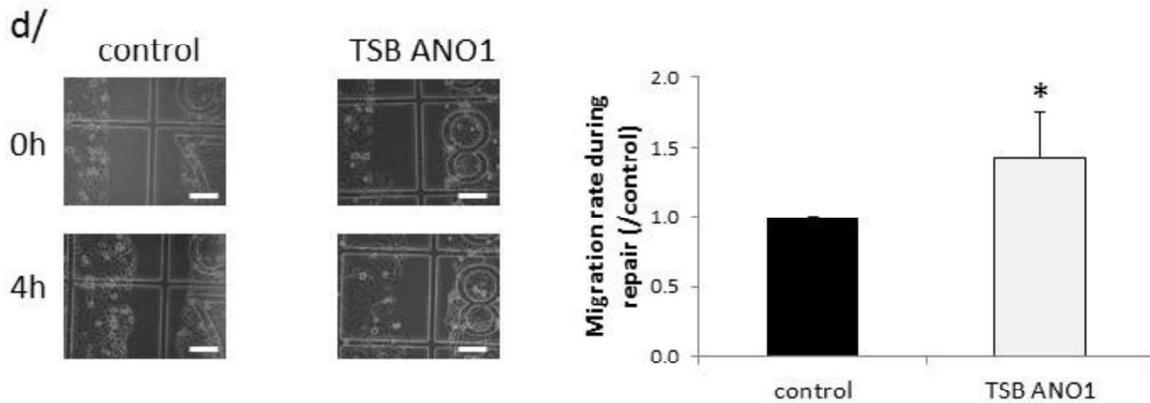


b/

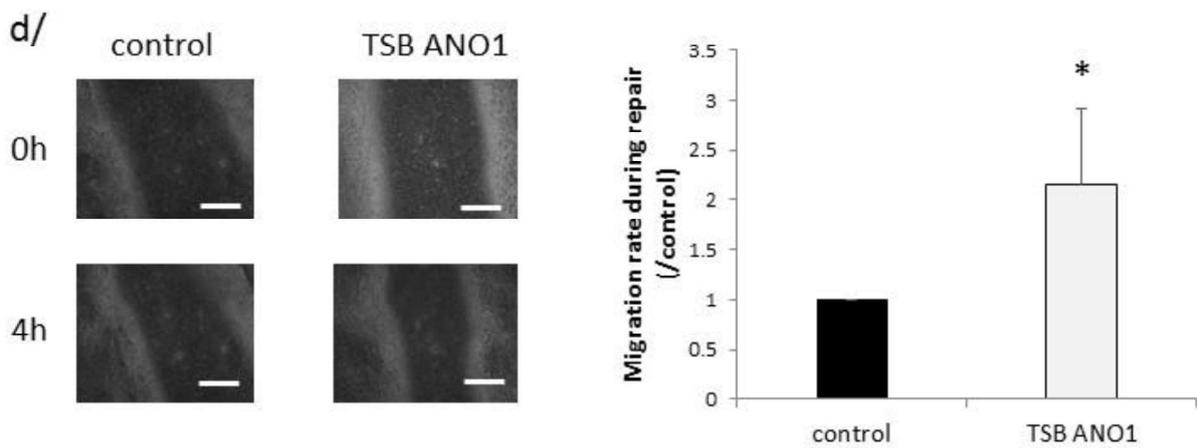
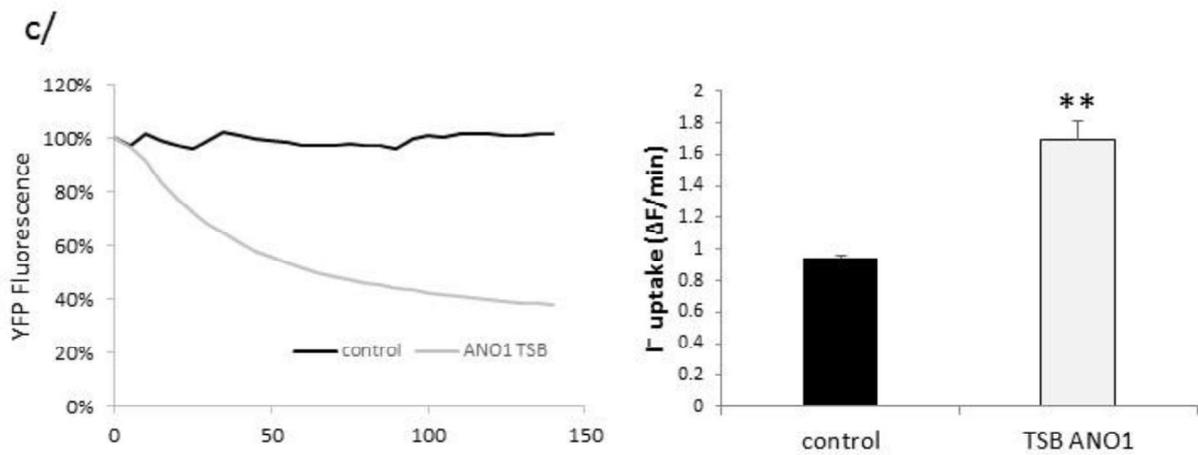
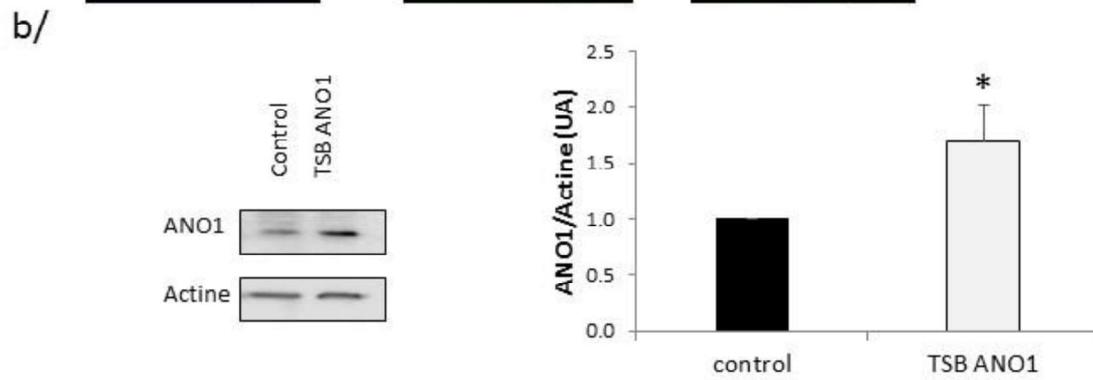
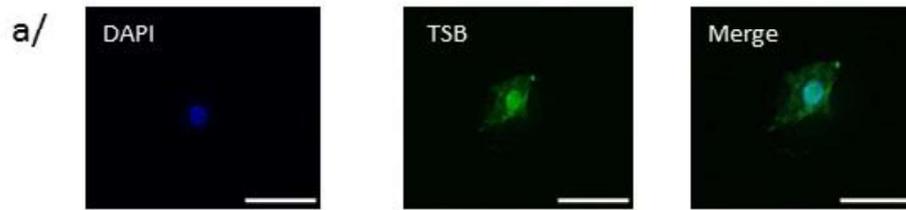


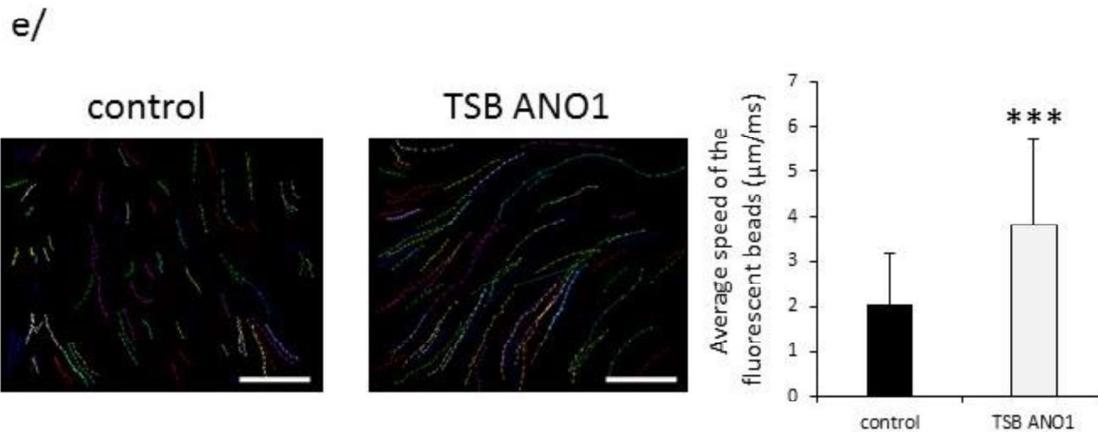
c/





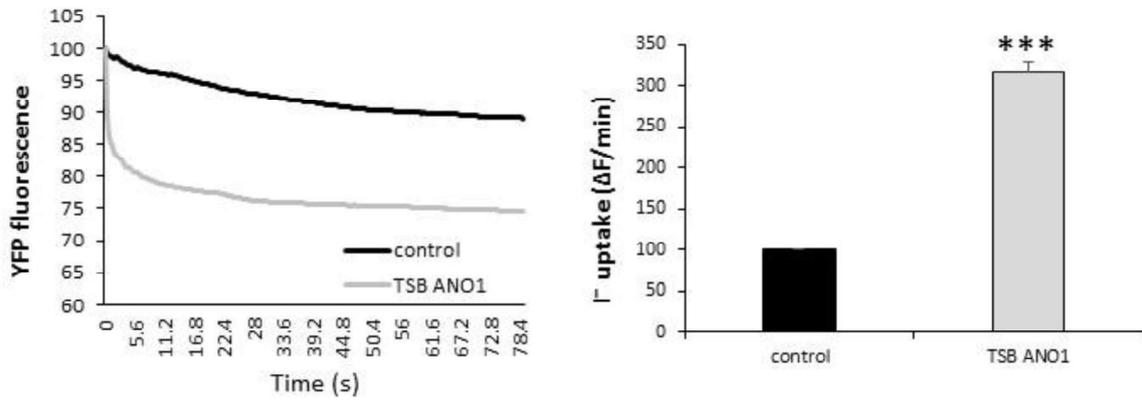
**Figure 4** miR-9-specific TSB increases ANO1 expression, chloride activity, and migration rate of CF cells. CF cells (CFBE41o-) were transfected with TSB control (control) or ANO1 TSB for 24 h. (a) ANO1 protein expression was analyzed and quantified by western blotting using anti-ANO1 antibody.  $\beta$ -actin was used for normalization. ( $n = 4$  in triplicates). Histograms represent average values  $\pm$  SDs and were compared using Student's *t*-test. (b) Kinetics of YFP-H148Q/I152L protein quenching after addition of  $I^-$  to the medium. Twenty-four hours after transfection with YFP-H148Q/I152L plasmid, cells were selectively microinjected with TSB control or ANO1 TSB as indicated. Scale bar 5  $\mu$ m. (c) Representative and original traces of ANO1 channel activity (left) and quantification (right) of CF bronchial epithelial cells transfected with ANO1 TSB or a negative control ( $n = 8$ , in triplicate) as compared to non-CF cells (16HBE14o-). Histograms represent average values  $\pm$  SDs and the conditions were compared using one-ANOVA test coupled with Dunnett's, Bonferroni's and Tukey's post-hoc test. (d) Migration rates during repair of CF cells. Representative images were taken during 4 h of wound closure of CF cells (left) and migration rates were quantification (right) ( $n = 5$ ). Scale bar 10  $\mu$ m. Histograms represent average values  $\pm$  SDs and were compared using Student's *t*-test.



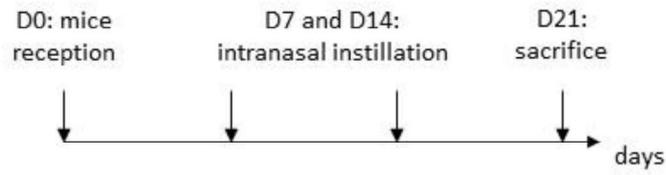


**Figure 5** miR-9-specific TSB allows increasing ANO1 expression, chloride activity, and migration rate of primary CF cells. Primary hAECB and fully differentiated human bronchial air–liquid-interface cultures, isolated from bronchial biopsies from CF (F508del/F508del) patients were transfected with TSB control (control) or ANO1 TSB every day during 3 days. **(a)** Confocal microscopic analysis of fluorescein-conjugated TSB transfected into human bronchial cells isolated from CF patients (green). The nuclei were stained with DAPI (blue) and merged images are shown. Scale bars 10  $\mu\text{m}$ . **(b)** ANO1 protein expression was analyzed and quantified by western blotting using anti-ANO1 antibody.  $\beta$ -actin was used for normalization. ( $n = 6$ ) Histograms represent average values  $\pm$  SDs and were compared using Student’s *t*-test. **(c)** Representative and original traces of ANO1 channel activity (left) and quantification (right) of hAECB CF cells transfected with ANO1 TSB or a negative control ( $n = 4$ ). **(d)** Migration rates during repair of primary CF cells. Representative photographs were taken during 4 h of wound closure of CF cells (left) and migration rates were quantification (right) ( $n = 4$ ). Scale bar 20  $\mu\text{m}$ . Histograms represent average values  $\pm$  SDs and were compared using Student’s *t*-test. **(e)** Effect of TSB control or ANO1 TSB on mucus dynamics after 30 days of transfection. The movements of 100 beads were quantified for each condition and the average speed ( $\mu\text{m}/\text{ms}$ ) was determined. Scale bar 40  $\mu\text{m}$ . Histograms represent the average values  $\pm$  SDs and were compared using Student’s *t*-test.

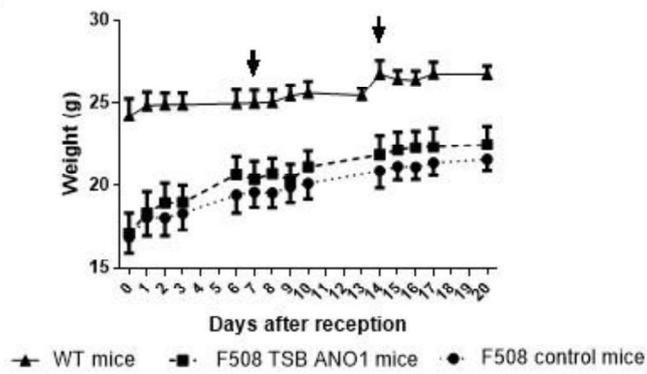
a/



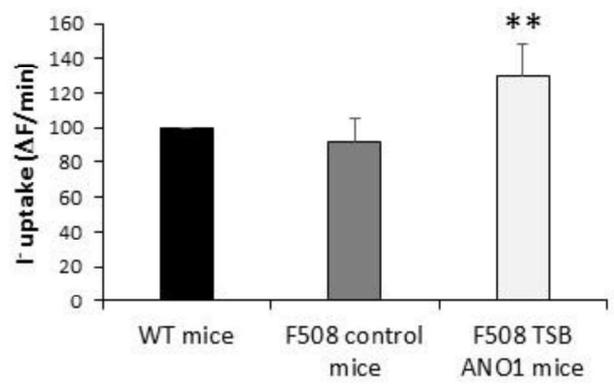
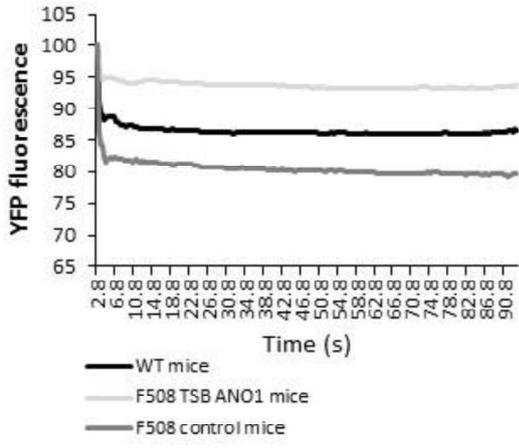
b/



c/



d/



## 2. Résultats complémentaires

### 1ere partie : Régulation d'ANO1

#### 2.1. Régulation d'ANO1 par les microARN

##### 2.1.1. Matériel et méthodes

Nous avons transfecté des cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o-) avec un mimic de miR-9 (hsa-miR-9-5p), un mimic de miR-144 (hsa-miR-144-3p), un mimic de miR-19a (hsa-miR-19a-3p) ou un contrôle inhibiteur négatif (Life Technologie, Saint-Aubin, France) à des concentrations de 30 nM, 48h avec l'agent de transfection HiPerfect (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Les miARN et ARN sont extraits à l'aide du kit *Nucleospin miRNA* (Macherey-Nagel, Hoerd, France) selon le protocole fourni dans un volume d'élution final de 30 µL. La concentration et la qualité des miARN et ARN sont déterminées par Nanodrop. L'obtention d'ADNc se fait à partir de 20 ng des miARN totaux, à l'aide du kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit* (Life Technologie) selon le protocole fourni par le kit, dans un volume réactionnel de 15 µL. L'obtention d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des cellules en culture, se fait à partir de 1 µg des ARN totaux, à l'aide du kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologie) selon le protocole fourni, avec un volume réactionnel final de 20 µL.

L'expression des transcrits est mesurée par qPCR en utilisant des sondes Taqman ANO1 (Hs00216121\_m1), GAPDH (Hs03929097\_g1), miR-9 (000583), miR-19a (000395), miR-144 (002676) et RNU6B (001093) (Life Technologies). L'expression des miARN est normalisée par l'expression du RNU6B. L'expression d'ANO1 est normalisée par la GAPDH. Pour chaque gène et chaque condition, la qPCR est réalisée en triplicat. 1 µL d'ADNc est mis en présence de *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix 2X* (Life Technologies) dans un volume réactionnel final de 10 µL. Les qPCR sont effectuées avec le thermocycler Applied Biosystems StepOnePlus.

Des sondes *SmartFlare*<sup>™</sup> (Merck millipore, Guyancourt, France) de miR-9 ou contrôle ont été ajoutées au milieu de culture des cellules à une concentration finale de 200 pM pendant 24h à 37°C. Les cellules ont ensuite été transfectées avec le mimic de miR-9 ou le contrôle négatif. Les signaux du *SmartFlare*<sup>™</sup> représentatifs de la quantité d'ARN sont visualisés sur un microscope Axiovert 200 (Zeiss, Marly le Roi, France).

Afin d'étudier la liaison des miARN prédits au 3'UTR d'ANO1, nous avons effectué une double transfection de la lignée non CF 16HBE14o<sup>-</sup> : d'une part en transfectant les mimics de miARN prédits, et d'autre part en transfectant un plasmide luciférase couplé au 3'UTR d'ANO1 et un plasmide renilla luciférase (contrôle interne) grâce à l'agent de transfection ExGen 500 (Euromedex, Strasbourg, France). 48h après la transfection, les cellules sont lysées, 20µl du lysat sont récupérés dans une plaque 96 puits EIA/RIA banche à fond blanc. La luciférase est alors révélée grâce au kit *Dual-Luciferase Reporter Assay* de chez Promega sur le lecteur de plaques FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France).

### 2.1.2. Prédiction bio-informatiques

Des logiciels de prédiction des cibles des miARN ont été développés sur la base des règles d'appariement entre miARN et ARNm. Nous avons utilisé les bases de données les plus utilisées (TargetScan, PicTar, miRDB et miRANDA) afin d'identifier quels miARN pourraient cibler ANO1. Ces différentes bases utilisant des paramètres et algorithmes différents mais complémentaires, nous avons recoupé dans le Tableau 3 les résultats des différentes bases de données afin d'identifier les miRNAs prédits pour cibler ANO1.

TargetScan	PicTar	miRDB	miRANDA
19a	9	144	9
19b	19a	9	144
9	19b	19a	19a
144	3 autres	19b	19b
15 autres		52 autres	

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des miARN prédits pour cibler ANO1 d'après différentes bases de données.

D'après les différentes bases de données utilisées, quatre miARN : les miARN 9, 19a, 19b et 144 pourraient se fixer sur la séquence 3'UTR d'ANO1 et donc réguler son expression.

### 2.1.3. Efficacité de la transfection du mimic de miR-9

Afin d'étudier la régulation d'ANO1 par miR-9, nous avons transfecté nos cellules avec un mimic de miR-9, nous avons vérifié la bonne transfection des cellules par RT-qPCR (Figure 32a) et par microscopie en utilisant une technique de visualisation des miARN appelée *smartflare* (Figure 32b).

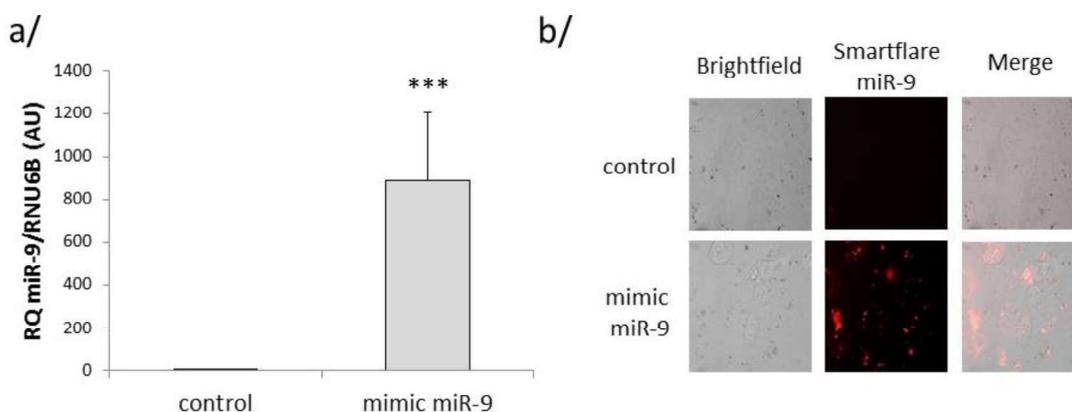


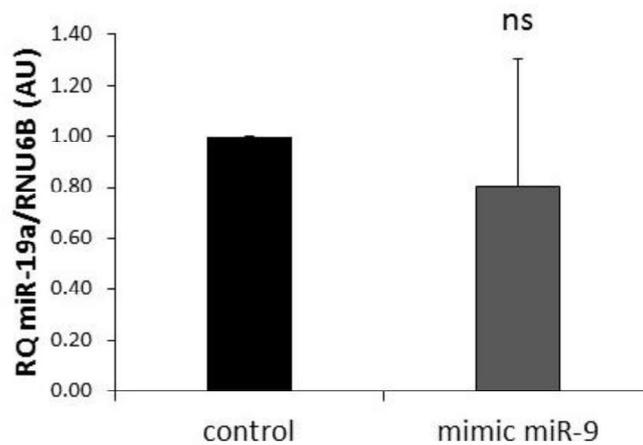
Figure 32 : Efficacité de la transfection du mimic de miR-9.

a/ Quantification de l'expression de miR-9 rapportée au RNU6B dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o) transfectées avec un mimic de miR-9 ou un contrôle négatif pendant 48h. b/ Observation au microscope des signaux SmartFlare™ de la sonde miR-9 en rouge.

La Figure 32a montre que l'expression de miR-9 augmente de façon significative lorsque les cellules sont transfectées avec le mimic de miR-9. Les images obtenues avec le smartflare™ nous confirment ces résultats : le marquage rouge est plus abondant dans les cellules transfectées avec le mimic de miR-9, ce qui montre une augmentation de la quantité d'ARN (Figure 32b). La transfection des cellules est donc efficace.

### 2.1.4. Spécificité de la transfection du mimic de miR-9

Nous avons vérifié la spécificité de la transfection du mimic de miR-9 en quantifiant l'expression d'un autre miARN, le miR-19a après transfection du mimic de miR-9.

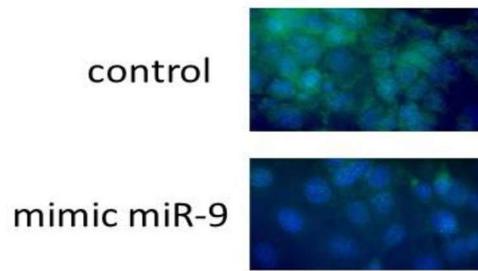


**Figure 33 : Spécificité de la transfection du mimic de miR-9.**  
 Quantification de l'expression de miR-19a rapportée au RNU6B dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o) transfectées avec un mimic de miR-9 ou un contrôle négatif pendant 48h.

Alors que nous avons observé précédemment que l'expression de miR-9 était significativement augmentée suite à la transfection du mimic de miR-9, nous n'observons pas de différence significative au niveau de l'expression du miR-19a lorsque miR-9 est surexprimé par rapport à la condition contrôle (Figure 33). Nous en concluons donc que la transfection de notre mimic est spécifique.

### 2.1.5. Effet de miR-9 sur ANO1

Dans l'article, nous avons montré que la surexpression de miR-9 dans la lignée 16HBE14o entraînant une diminution significative de l'expression protéique d'ANO1 par western-blot. Nous avons voulu confirmer ces résultats à l'aide d'une autre technique, l'immunocytochimie.



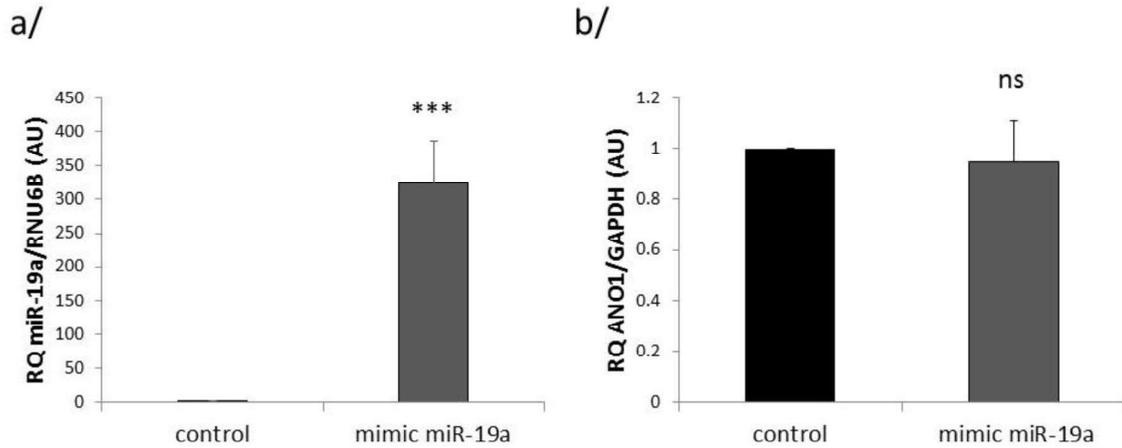
**Figure 34 : Effet du mimic de miR-9 sur l'expression protéique d'ANO1.**  
Des cellules non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) ont été transfectées avec un mimic de miR-9 ou un contrôle négatif 48h. La localisation et l'expression d'ANO1 sont évaluées par immunocytochimie (vert : ANO1 ; bleu : DAPI).

La Figure 34 met en évidence un marquage d'ANO1 moins intense lorsque miR-9 est surexprimé par rapport à la condition contrôle. La surexpression de miR-9 diminue l'expression d'ANO1 dans les cellules.

### 2.1.6. Effet du miR-19a sur ANO1

Les études bio-informatiques que nous avons effectuées sur quatre bases de données (PicTar, miRDB, miRanda, Targetscan) ont montré que quatre miARN étaient prédits pour cibler ANO1 : miR-9, miR-19a, miR-19b et miR-144 (voir Tableau 3).

Des tests préliminaires effectués sur miR-19a et miR-19b nous ont montré que ces miARN corrèlent parfaitement. Afin de savoir si miR-19a et miR-19b régulent ANO1, nous avons transfecté la lignée cellulaire épithéliale bronchique non CF 16HBE14o<sup>-</sup> avec un mimic de miR-19a. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'efficacité de la transfection en quantifiant l'expression de miR-19a par qPCR, puis nous avons quantifié l'expression d'ANO1.

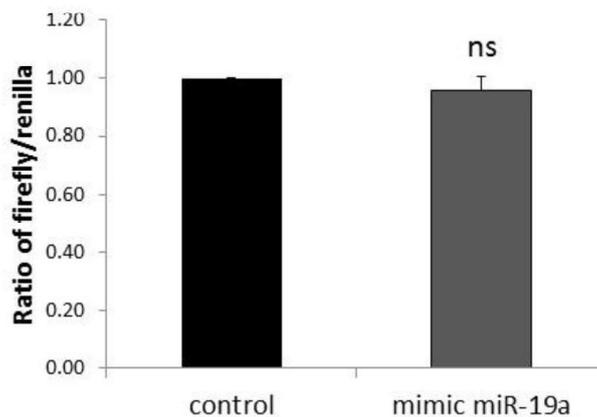


**Figure 35 : Transfection du mimic de miR-19a et effet sur le transcrit ANO1.**

**a/ Quantification de l'expression de miR-19a rapportée au RNU6B dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) transfectées avec un mimic de miR-19a ou un contrôle négatif pendant 48h.**

**b/ Quantification de l'expression de l'ARNm ANO1 rapportée à la GAPDH dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) transfectées avec un mimic de miR-19a ou un contrôle négatif pendant 48h.**

Les résultats obtenus sur la Figure 35 nous montrent qu'il y a bien transfection du mimic et augmentation de l'expression de miR-19a suite à la transfection de ce dernier (Figure 35a). L'expression d'ANO1 en revanche reste inchangée suite à la modulation du miR-19a (Figure 35b). En parallèle de ces expériences, nous avons co-transfecté la lignée non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) avec un plasmide luciférase couplé au 3'UTR d'ANO1 et le mimic de miR-19a ou un contrôle négatif.



**Figure 36 : Etude de la liaison du miR-19a au 3'UTR d'ANO1.**

**Quantification de l'activité luciférase normalisée par la renilla dans des cellules non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) co-transfectées avec un plasmide luciférase 3'UTR d'ANO1 et le mimic de miR-19a ou un contrôle négatif.**

Les résultats présentés sur la Figure 36 ne montrent pas de différence significative de l'activité luciférase entre les conditions contrôle et surexpression de miR-19a. Nous en concluons donc que ce miARN ne se lie pas au 3'UTR d'ANO1.

### 2.1.7. Effet du miR-144 sur ANO1

Le miR-144 était également prédit pour réguler ANO1 par les bases de données bio-informatiques. Nous avons donc transfecté la lignée non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) avec un mimic de miR-144. Après vérification de l'efficacité de la transfection du mimic (Figure 37a), nous avons quantifié l'expression d'ANO1 par RT-qPCR.

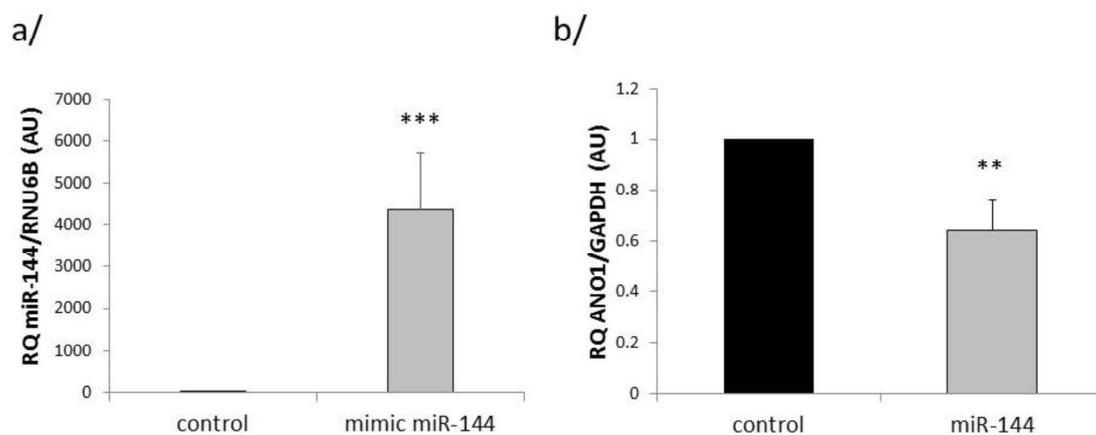
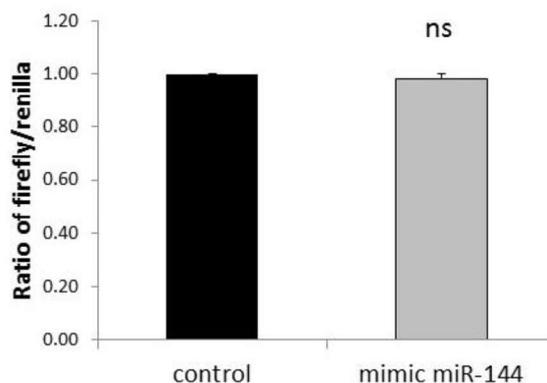


Figure 37 : Transfection du mimic de miR-144 et effet sur le transcrit ANO1.

a/ Quantification de l'expression de miR-144 rapportée au RNU6B dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) transfectées avec un mimic de miR-144 ou un contrôle négatif pendant 48h.

b/ Quantification de l'expression de l'ARNm ANO1 rapportée à la GAPDH dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) transfectées avec un mimic de miR-144 ou un contrôle négatif pendant 48h.

Les résultats présentés sur la Figure 37b indiquent que l'expression d'ANO1 est significativement diminuée lorsque miR-144 est surexprimé par rapport à la condition contrôle. Il semble donc que miR-144 régule ANO1. Pour savoir si la régulation d'ANO1 par le miR-144 est une régulation directe, nous avons co-transfecté la lignée non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) avec un plasmide luciférase couplé au 3'UTR d'ANO1 et le mimic de miR-144.



**Figure 38 : Etude de la liaison du miR-144 au 3'UTR d'ANO1.**

Quantification de l'activité luciférase normalisée par la renilla dans des cellules non CF (16HBE14o-) co-transfectées avec un plasmide luciférase 3'UTR d'ANO1 et le mimic de miR-144 ou un contrôle négatif.

Nous n'observons pas de différence significative entre les conditions contrôle et surexpression de miR-144. Nous en concluons donc que miR-144 ne régule pas ANO1 directement. Une étude a montré que ce miARN régule CFTR (Hassan et al. 2012). Nous posons donc l'hypothèse d'une boucle de régulation miR-144-CFTR-ANO1.

### 2.1.8. Conclusions

Ces différentes expériences nous permettent de conclure que parmi les différents miARN prédits pour réguler le canal ANO1, seul miR-9 régule directement ce dernier. Les miR-19a et miR-19b ne régulent pas ANO1 et miR-144 le régule indirectement. Nous avons de plus montré que la transfection des mimics était efficace et spécifique. Enfin, nous avons confirmé les résultats présentés dans l'article, c'est-à-dire une diminution de l'expression protéique d'ANO1 lorsque miR-9 est surexprimé par rapport à la condition contrôle.

## 2.2. Régulation de miR-9

Nous avons mis en évidence une surexpression de miR-9 dans des cellules CF par rapport aux non CF. Nous nous sommes donc intéressés à d'autres modèles afin d'observer si la dérégulation de miR-9 est également observée dans ces derniers. De plus, afin de savoir pourquoi l'expression de miR-9 est dérégulée dans le contexte CF, nous avons modulé l'expression de CFTR dans des lignées de cellules épithéliales bronchiques non CF ou CF et observé les conséquences sur l'expression de miR-9. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'IL-4 sur l'expression de miR-9 puisqu'il a été montré précédemment par l'équipe de Galletta que cette cytokine stimulait l'expression d'ANO1 (Caputo et al. 2008).

### 2.2.1. Matériels et méthodes

Afin de mesurer l'expression de miR-9 au niveau des voies aériennes humaines, nous avons réalisé des PCR quantitatives à partir d'ARNm extraits d'explants pulmonaires bronchiques de patients CF et non CF. Les tissus ont été collectés et traités en conformité avec la législation actuelle de santé publique française (articles L.1235-2 and L.1245-2, code de la santé publique, [www.legifrance.gouv.fr](http://www.legifrance.gouv.fr)). Chaque institution participante a informé les patients et s'est assurée qu'ils n'étaient pas opposés à l'utilisation, à des fins de recherche, d'échantillons chirurgicaux prélevés au cours d'un acte médical. Les dissections ont été réalisées par le Dr. S. Blouquit-Laye (Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, UFR des sciences de la santé, Montigny-Le-Bretonneux, France). Les explants non CF proviennent de biopsies de zones saines de patients atteints d'un cancer du poumon ; les explants CF proviennent de patients atteints de mucoviscidose bénéficiant d'une greffe. Les bronches ont été identifiées sur la base d'un diamètre externe de 3 à 12 mm et de la présence de cartilage. Les explants humains sont broyés par une sonde Polytron dans 1 mL de TRIzol (Life Technologies). Par la suite, les échantillons suivent le protocole modifié de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Ils sont mis en présence de SEVAG (mélange chloroforme/acide isoamylique dans un rapport 48/2). Après centrifugation, le surnageant est récupéré et les ARN sont précipités dans l'isopropanol à froid. Le culot d'ARN, lavé deux fois dans de l'éthanol 70% est repris dans 50 µl d'eau stérile (Sigma-Aldrich).

Les plasmas ont été prélevés au cours de prises de sang contrôles annuelles chez 25 patients CF (homozygotes pour la mutation F508del) âgés de 13 à 18 ans avec une moyenne d'âge de 15 ans et 26 patients non CF âgés de 20 à 43 ans avec une moyenne d'âge de 25 ans. Les prélèvements sanguins ont été centrifugés pendant 15 min à 3 000 g puis le plasma (surnageant) est récolté, aliquoté et stocké à -80°C. Les miARN ont été extraits à l'aide du kit *Nucleospin miRNA Plasma* (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant et élués avec de l'eau stérile sans RNase (30 µL). Les expériences de RT-qPCR (TaqMan) ont été réalisées avec les sondes hsa-miR-9-5p (478214\_mir) et hsa-miR-103 (478253\_mir) (contrôle endogène stable).

Afin de ré-adresser des protéines CFTR à la membrane plasmique, nous avons cultivé des cellules CFBE410<sup>-</sup> à 27°C après ensemencement sur plaques de culture pendant 24h. En parallèle, des cellules CFBE410<sup>-</sup> sont cultivées à 37°C pour constituer les contrôles.

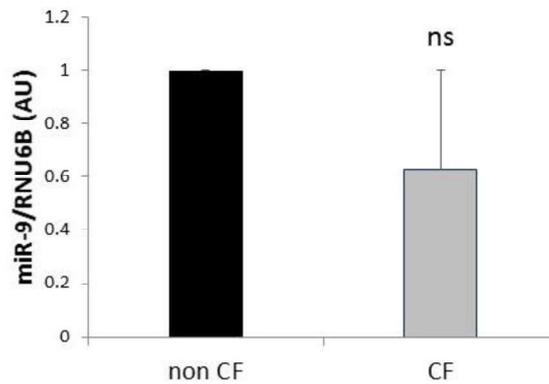
Dans le but d'étudier l'effet de la conductance Cl<sup>-</sup> de CFTR, nous avons traité les cellules non CF 16HBE140<sup>-</sup> avec l'inhibiteur CFTR-inh172 (VWR International, Pessac, France) à une concentration finale de 10 µM pendant 24h.

Dans le but d'étudier l'influence de l'IL-4 sur l'expression d'ANO1, nous avons stimulé la lignée cellulaire épithéliale bronchique non CF 16HBE140<sup>-</sup> avec de l'IL-4 (10 ng/mL) pendant 24h.

## 2.2.2. Expression de miR-9 dans les explants bronchiques et le plasma

### a) Explants bronchiques

Nous avons observé une surexpression de miR-9 dans les cellules CF par rapport aux non CF. Nous nous sommes donc intéressés à d'autres modèles comme les explants bronchiques pour regarder si nous observons la même dérégulation *ex vivo*.

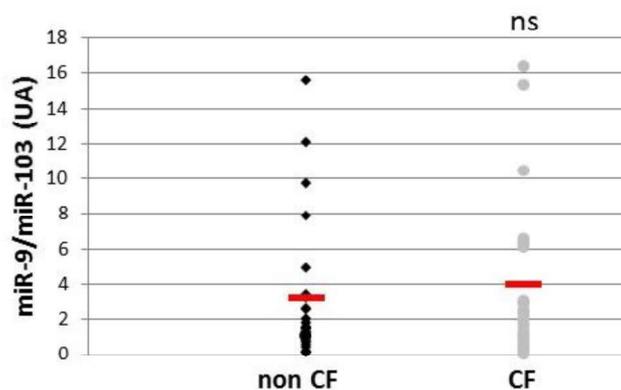


**Figure 39 : Expression de miR-9 dans des explants bronchiques CF et non CF.**  
Quantification de l'expression de miR-9 rapportée au RNU6B dans des explants bronchiques CF (n=14) et non CF (n=21).

Nous n'observons pas de différence significative de l'expression de miR-9 entre les explants bronchiques CF et non CF (Figure 39). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela comme la forte variabilité inter-individuelle, la présence de populations cellulaires hétérogènes, les statuts infectieux et inflammatoires des poumons CF qui pourraient avoir un effet sur l'expression de miR-9.

### b) Plasmas

Nous avons de plus étudié l'expression de miR-9 dans les plasmas de patients CF et non CF.



**Figure 40 : Expression de miR-9 dans les plasmas CF et non CF.**  
Quantification de l'expression de miR-9 rapportée au miR-103 dans des plasmas CF (n=25) et non CF (n=26).

Nous n'avons pas observé de différence significative de l'expression de miR-9 dans les plasmas issus de patients CF et non CF (Figure 40).

### 2.2.3. Effet de l'IL-4

Nos résultats ont montré que miR-9 est surexprimé dans les cellules CF par rapport aux cellules non CF. Nous nous sommes donc intéressés aux raisons de cette dérégulation dans le contexte CF et avons testé plusieurs hypothèses.

Les travaux de l'équipe de Galietta ont montré que l'expression d'ANO1 était augmentée dans les cellules suite à une stimulation des cellules par de l'interleukine 4 (IL-4) (Caputo et al. 2008). Nous avons donc stimulé la lignée cellulaire épithéliale bronchique non CF 16HBE14o<sup>-</sup> avec de l'IL-4 puis nous avons extrait les miARN et les ARN des cellules.

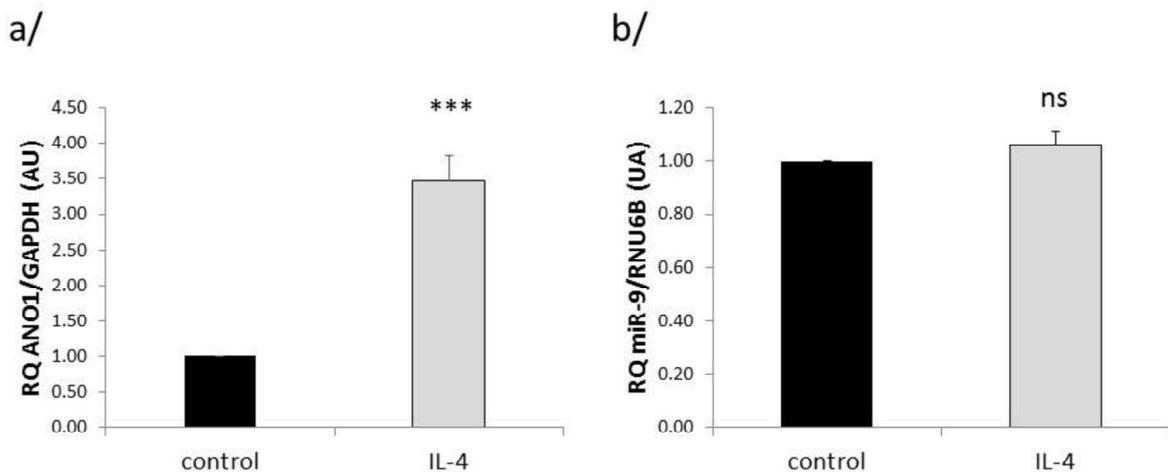


Figure 41 : Effet de l'IL-4 sur les expressions d'ANO1 et de miR-9.

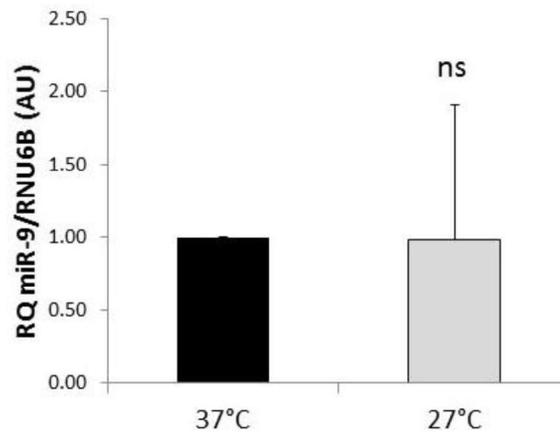
a/ Quantification de l'expression de l'ARNm ANO1 rapportée à la GAPDH dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) stimulées avec de l'IL-4 pendant 24h.

b/ Quantification de l'expression de miR-9 rapportée au RNU6B dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) stimulées avec de l'IL-4 pendant 24h.

La Figure 41a confirme les résultats obtenus par l'équipe de Galietta, l'IL-4 augmente significativement l'expression d'ANO1 dans nos cellules. En revanche, l'expression de miR-9 est inchangée suite à la stimulation par l'IL-4 (Figure 41b) suggérant l'existence d'autres systèmes de régulation de miR-9 passant peut-être directement par CFTR.

#### 2.2.4. Effet du ré-adressement de CFTR

La mutation F508del altère la maturation de la protéine CFTR et l'abaissement de la température de culture des cellules CF permet de ré-adresser à la membrane plasmique une partie des protéines CFTR non matures accumulées dans le réticulum endoplasmique. Nous avons donc quantifié l'expression de miR-9 par RT-qPCR dans des cellules CF cultivées à 37°C ou 27°C.

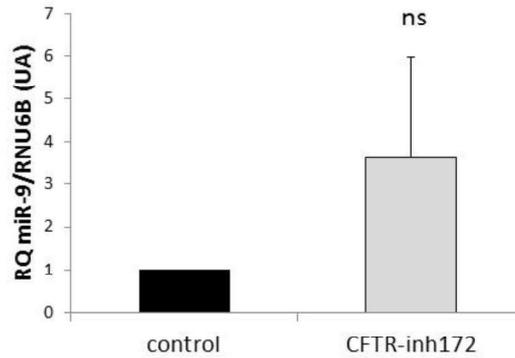


**Figure 42 : Effet de la température sur l'expression de miR-9.**  
Quantification de l'expression de miR-9 rapportée au RNU6B dans les cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o-) cultivées à 37°C ou 27°C pendant 24h.

Les résultats présentés sur la Figure 42 nous indiquent que l'expression de miR-9 ne varie pas lorsque les cellules sont cultivées à 27°C par rapport aux cellules cultivées à 37°C. Le ré-adressement à la membrane d'une protéine CFTR mutée n'a pas d'effet sur l'expression de miR-9.

#### 2.2.5. Effet de l'inhibition de CFTR

La conductance Cl<sup>-</sup> de CFTR peut être inhibée par un inhibiteur appelé CFTR-inh172, nous avons ici mesuré les conséquences de l'utilisation de cet inhibiteur sur l'expression d'ANO1 dans des cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o-).



**Figure 43 : Effet de l'inhibiteur CFTR-inh172 sur l'expression de miR-9.**  
 Quantification de l'expression de miR-9 rapportée au RNU6B dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o) traitées ou non avec l'inhibiteur CFTR-inh172.

Les résultats présentés sur la Figure 43 nous montrent que l'expression de miR-9 semble augmenter lorsque les cellules non CF sont traitées avec l'inhibiteur CFTR-inh172. La présence ou non d'une conductance chlorure liée à CFTR semble donc moduler l'expression de miR-9.

### 2.2.6. Conclusions

Ces différentes expériences nous ont permis d'observer une tendance à l'augmentation de l'expression de miR-9 dans des cellules non CF dans lesquelles la conductance  $Cl^-$  de CFTR est inhibée. Nous n'avons en revanche pas observé de différence significative de l'expression de miR-9 lorsque nous stimulons des cellules CF avec de l'IL-4 ou lorsque nous les cultivons à 27°C. De plus, nous n'observons pas de différence significative de l'expression de miR-9 dans des explants bronchiques et des plasmas CF *versus* non CF.

## 2.3. Résultats complémentaires sur le TSB ANO1

### 2.3.1. Matériels et méthodes

Des lignées cellulaires épithéliales bronchiques CF (CFBE41o<sup>-</sup>), glandulaires bronchiques CF (KM4) et pancréatiques CF (CFPAC1) ont été transfectées avec un LNA contrôle ou le TSB ANO1 (50nM) (Exiqon, Vedbaek, Danemark) avec de l'interferine (Polyplus, Illkirch, France) pendant 24h.

L'activité chlorure liée à ANO1 a été mesurée en utilisant la technique du premo halide sensor. Les cellules sont transfectées avec une sonde fluorescente YFP sensible aux ions halogénures (YFP-H148Q/I152L) (Thermo Fischer Scientific). Après 48 heures de culture, la conductance chlorure d'ANO1 est stimulée avec de l'UTP (10 μM). Une solution d'ions I<sup>-</sup> est ajoutée (140 mM) et la fluorescence est enregistrée sur le lecteur de plaque FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech).

L'IL-8 a été dosée par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) à l'aide du kit *human IL-8 Duo Set Kit* (R&D Systems, Lille, France) suivant les instructions du fabricant, dans les surnageants de culture des cellules CFBE41o<sup>-</sup> 24h après la transfection avec le LNA contrôle ou le TSB ANO1.

24h après la transfection des cellules CFBE41o<sup>-</sup>, nous avons infecté les cellules avec la souche PAK Lux de *P. aeruginosa* qui est une souche modifiée émettant de la luminescence lorsque les cellules sont vivantes. Les cellules sont infectées avec la souche PAK Lux à la MOI (*multiplicity of infection*) 0,1 (0,1 bactérie pour une cellule) ou 0,25 durant 6h. Des mesures de luminescence sont effectuées toutes les heures.

Afin d'étudier la stabilité du TSB ANO1, nous avons incubé le TSB ANO1 dans des fluides biologiques issus de patients CF (plasma et expectoration) ou en présence de DNase à différents temps (1h, 8h, 1j, 2j, 4j, 7j). Nous avons ensuite évalué la dégradation du TSB sur gel d'acrylamide.

### 2.3.2. Effets dose

Nous avons transfecté les cellules CFBE410<sup>-</sup> avec le TSB ANO1 à différentes concentrations puis nous avons étudié les efflux chlorures d'ANO1 suite à cette expérience.

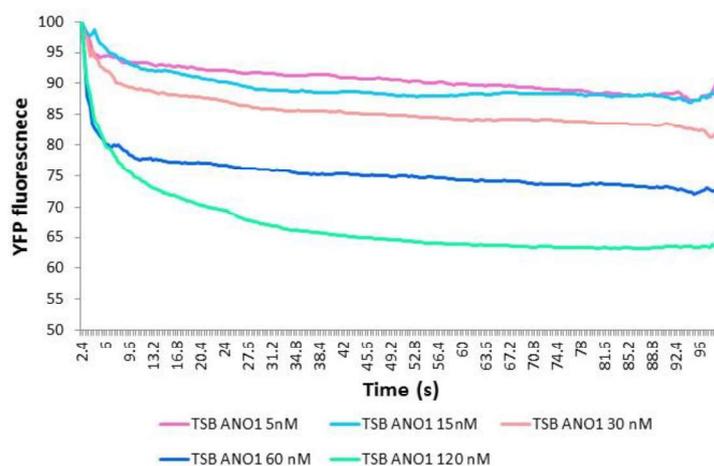


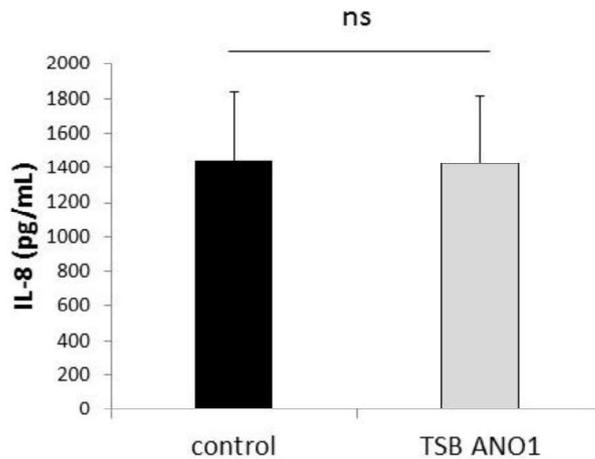
Figure 44 : Effet dose-réponse du TSB ANO1.

Tracés représentatifs de l'activité chlorure liée à ANO1 de cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE410<sup>-</sup>) transfectées avec différentes concentrations de TSB ANO1 (5 ; 15 ; 30 ; 60 ; 120 nM) pendant 24h.

Les résultats présentés sur la Figure 44 nous montrent qu'il existe un effet dose-dépendant du TSB. Dans le reste de nos expériences, nous avons utilisé la concentration de 50 nM, qui est une dose intermédiaire et n'induit pas de changement morphologique des cellules.

### 2.3.3. Effet du TSB sur l'inflammation

Pour aller plus loin, nous nous sommes demandés si notre TSB avait un effet sur l'inflammation de cellules bronchiques. Nous avons donc dosé par ELISA l'IL-8 dans le surnageant de cellules CFBE410<sup>-</sup> transfectées avec notre TSB ANO1 ou un LNA contrôle durant 24h. Nous nous sommes intéressés à l'IL-8 car c'est la chimiokine représentative de l'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose.



**Figure 45 : Effet du TSB ANO1 sur la sécrétion d'IL-8.**

Des cellules épithéliales bronchiques CFBE410 ont été transfectées avec un contrôle ou TSB ANO1, l'IL-8 est dosée par ELISA dans les surnageants des cellules 24h après la transfection.

La Figure 45 montre qu'il n'y pas de différence significative de la sécrétion d'IL-8 entre les cellules transfectées avec le TSB ANO1 ou les cellules transfectées avec le LNA contrôle. L'IL-8 est une chimiokine très fortement exprimée chez le patient CF, reflet d'une inflammation chronique et excessive, l'effet du TSB ANO1 sur la sécrétion d'IL-8 est donc un paramètre important à étudier. Le fait que nous n'observons pas de différence significative de la sécrétion d'IL-8 entre les conditions contrôle et TSB ANO1 suggère que l'introduction de notre TSB n'induit pas de sur-inflammation des cellules épithéliales bronchiques.

#### **2.3.4. Effet du TSB sur la croissance bactérienne**

Dans les poumons de patients CF, il existe une infection persistante. La pathogène le plus fréquemment rencontré dans les poumons de patients adultes est *P. aeruginosa*. Dans l'éventualité d'une application thérapeutique, nous nous sommes intéressées à l'effet de notre TSB ANO1 sur la croissance bactérienne.

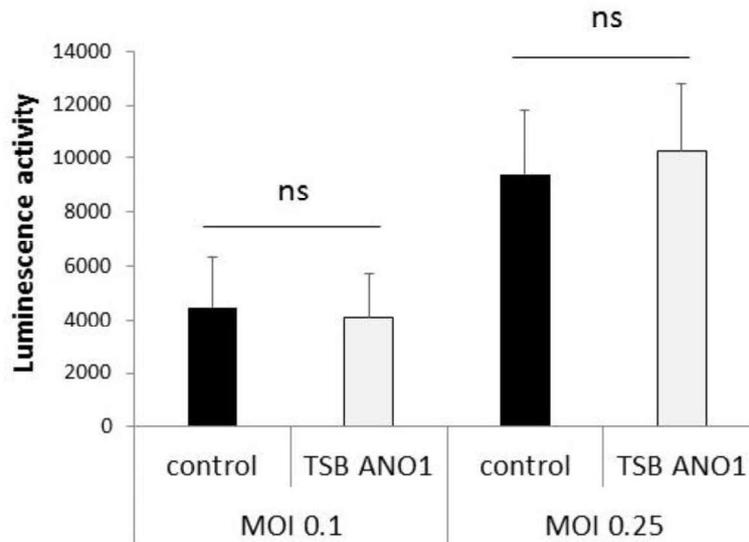


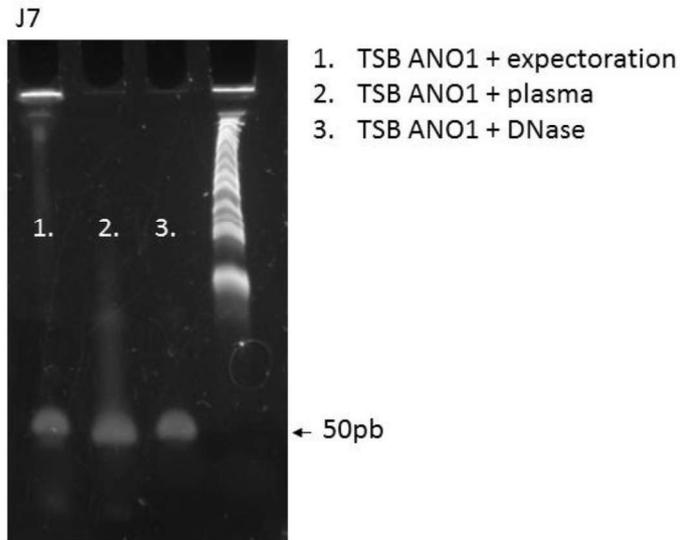
Figure 46 : Effet du TSB ANO1 sur la croissance bactérienne.

Des cellules épithéliales bronchiques CFBE410<sup>-</sup> ont été transfectées avec un contrôle ou TSB ANO1, puis infectées avec la souche PAK Lux de *Pseudomonas aeruginosa* aux MOI 0,1 et 0,25. La mesure de la luminescence est représentative de la croissance bactérienne.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative de la luminescence entre les conditions LNA contrôle et TSB ANO1 aux deux MOI testées. Nous en concluons donc que le TSB ANO1 n'a pas d'effet sur la croissance bactérienne de *P. aeruginosa* (Figure 46).

### 2.3.5. Dégradation du TSB

Le TSB ANO1 comprend des modifications chimiques telles qu'une base LNA et des groupements phosphorothioates permettant d'apporter à la molécule une grande stabilité thermodynamique et d'empêcher sa dégradation par les nucléases. Afin de tester la dégradation de notre TSB, nous l'avons incubé en présence de DNase, d'expectoration ou de plasma de patient CF pendant 1h, 8h, 1j, 2j, 4j, et 7 jours à 37°C.

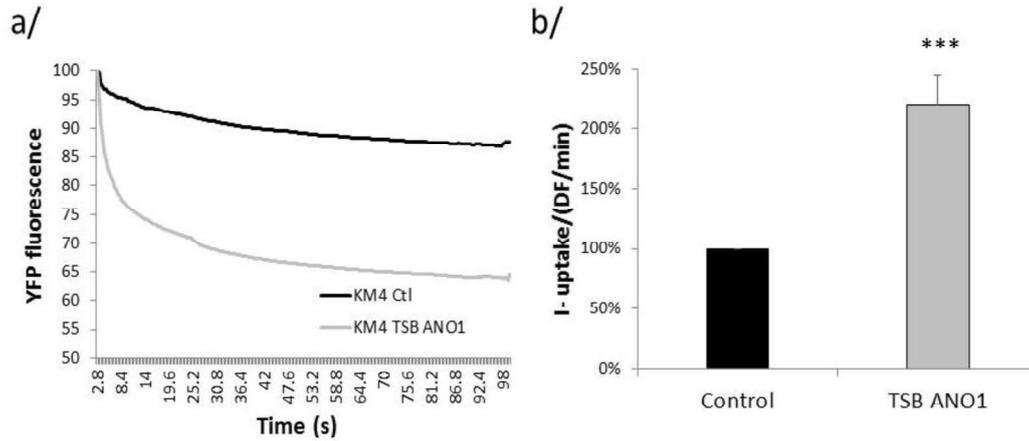


**Figure 47 : Expérience de dégradation du TSB ANO1 dans différents fluides.**  
Le TSB ANO1 a été incubé en présence d'expectoration ou de plasma ou de DNase pendant 7 jours à 37°C.

La Figure 47 nous montre qu'aucune dégradation du TSB n'est observée dans les différentes conditions, ce qui montre que la molécule est stable dans les milieux biologiques des patients CF.

### 2.3.6. Effet du TSB sur des cellules glandulaires

Les cellules glandulaires bronchiques expriment fortement CFTR et ont un rôle majeur dans la sécrétion de mucus (Jacquot et al. 1993). Nous nous sommes alors intéressés à l'effet du TSB ANO1 sur un modèle de lignée cellulaire glandulaire bronchique CF (KM4).

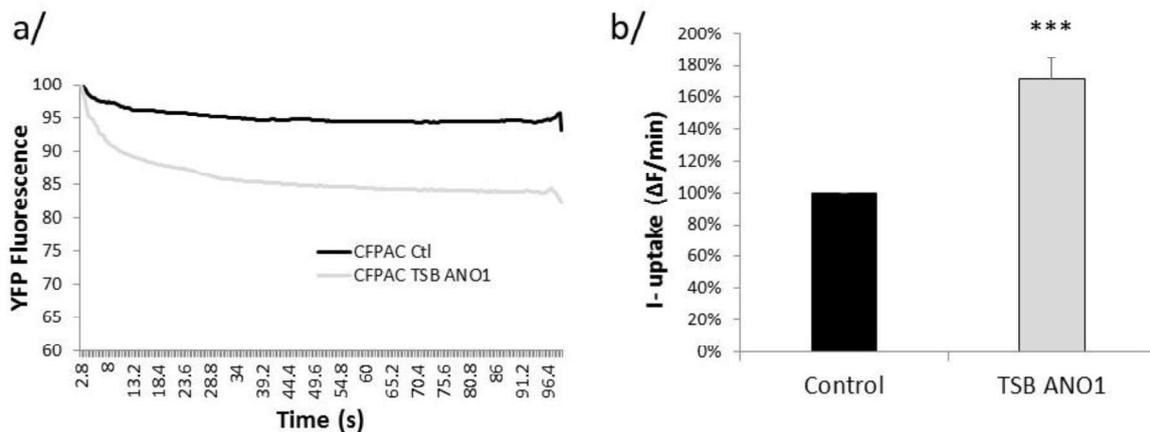


**Figure 48 : Effet du TSB ANO1 sur l'activité chlorure liée à ANO1 de cellules glandulaires CF.**  
Des cellules glandulaires CF (KM4) ont été transfectées avec un LNA contrôle ou le TSB ANO1 pendant 24h. Tracé représentatif (a) et quantification (b) des efflux chlorures liés à ANO1.

La Figure 48 nous montre que l'activité chlorure liée à ANO1 est augmentée de manière significative dans les cellules glandulaires bronchiques transfectées avec le TSB ANO1 par rapport aux cellules transfectées avec le contrôle. Le TSB ANO1 semble donc être une alternative thérapeutique intéressante pour pallier la déficience de CFTR au niveau pulmonaire.

### 2.3.7. Effet du TSB sur des cellules pancréatiques

Nous avons validé la preuve de concept de notre TSB au niveau pulmonaire. Dans l'éventualité où notre molécule serait donnée en clinique, le mode d'administration du TSB est à déterminer et pour cela, l'effet du TSB ANO1 sur d'autres modèles est à étudier. Nous avons donc étudié l'effet du TSB ANO1 dans un modèle de lignée cellulaire pancréatique CF : les CFPAC1.



**Figure 49 : Effet du TSB ANO1 sur l'activité chlorure liée à ANO1 de cellules pancréatiques CF.**  
Des cellules pancréatiques CF (CFPAC1) ont été transfectées avec un LNA contrôle ou le TSB ANO1 pendant 24h. Tracé représentatif (a) et quantification (b) des efflux chlorures liés à ANO1.

Nous observons une augmentation significative des efflux chlorures liés à ANO1 lorsque les cellules pancréatiques sont transfectées avec le TSB ANO1 par rapport aux cellules transfectées avec le LNA contrôle (Figure 49). Une voie d'administration systémique pourrait être envisagée dans le cadre d'une application thérapeutique.

### 2.3.8. Conclusions

Dans ces dernières expériences, nous avons pu observer que le TSB ANO1 avait non seulement un effet dans les cellules épithéliales bronchiques, mais aussi dans les cellules glandulaires bronchiques et dans des cellules pancréatiques CF. Nous avons de plus montré que le TSB ANO1 n'avait pas d'effet sur l'infection et l'inflammation de cellules CF et qu'il était stable en présence de différents fluides biologiques. L'ensemble de ces résultats suggère que le TSB ANO1 est aujourd'hui une cible thérapeutique pertinente pour les patients atteints de mucoviscidose et qu'un mode d'administration systémique du TSB ANO1 pourrait être envisagé pour pallier la déficience de CFTR sur le plan général.

## 2<sup>ème</sup> partie : Approche globale

### 2.4. Approche globale par miRNOME

Dans une seconde approche, nous avons effectué une extraction d'ARN et de miARN de cellules épithéliales bronchiques CF et non CF différenciées et cultivées en interface air-liquide à l'état basal. Nous avons utilisé des cellules issues de 5 patients CF et 5 patients non CF provenant de la société Epithelix. Les patients CF sont âgés de 25 à 29 ans avec une moyenne d'âge de 26,2 ans. Les patients non CF sont âgés de 63 à 81 ans avec une moyenne d'âge de 70,6 ans.

Afin d'étudier l'ensemble des ARN et des miARN dérégulés entre les cellules CF et non CF, plusieurs techniques peuvent être utilisées telles que les puces, la PCR *array* ou le séquençage. Chacune de ses techniques présente des avantages et des inconvénients. Les puces permettent d'étudier rapidement sur une même puce l'ensemble des miARN dérégulés mais la sensibilité des puces est faible pour les miARN peu exprimés et seuls les miARN décrits sont analysés. La technique de PCR *array* se base sur la technique de PCR temps réel et utilise des plaques dont les puits contiennent les amorces des miARN. Cette technique peut être effectuée au laboratoire et présente une bonne sensibilité. Cependant, seuls les miARN décrits sont analysés et le dépôt des échantillons doit être effectué par une personne très méticuleuse dans son pipetage. Enfin le séquençage NGS (*next-generation sequencing*) permet de séquencer l'ensemble des miARN, y compris ceux non décrits dans la littérature. Tous les petits ARN étant analysés, il y a la nécessité de pré-purifier les petits ARN à une taille maximale voulue et de grosses analyses bio-informatiques et bio-statistiques doivent être effectuées.

Nous avons choisi d'utiliser la technique de séquençage NGS. Pour cela, les miARN extraits ont été confiés à la plateforme de l'IPMC de Nice tandis que les ARN ont été confiés à la plateforme de transcriptomique de l'institut Pasteur à Paris. Les données du séquençage obtenu ont été analysées par des bio-statisticiens et bio-informaticiens des différentes plateformes afin de considérer les différences d'expression entre les cultures CF et non CF.

Les résultats du transcriptome ont montré une expression différentielle des ARN peu différente entre les cellules CF et non CF. Les résultats montrent que la première source de variabilité observée correspond à la différence au sein des échantillons non CF. La deuxième source de variabilité correspond à la différence entre les échantillons CF et non CF (Figure 50). 37 gènes sont dérégulés entre les deux types de cellules : 24 sous-exprimés et 13 surexprimés (Tableau 4).

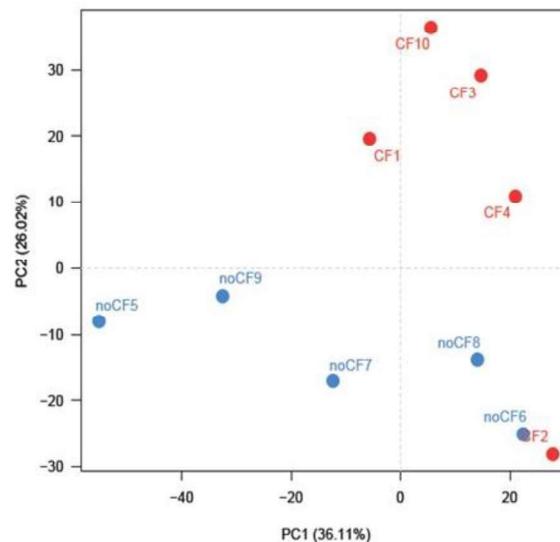


Figure 50 : Analyse en composantes principales des données issues du transcriptome.

Les résultats du miRNOME ont montré 14 miARN différemment exprimés entre les cellules CF et non CF. Ces miARN appartiennent à 7 familles : miR-639, miR-449, miR-199, miR-1247, miR-2682 et miR-4516 (Tableau 4). Aucun de ces miARN n'a été montré comme régulant CFTR dans la littérature.

Test vs Ref	Sous-exprimés	Surexprimés	Total
ARN CF vs non CF	24	13	37
miARN CF vs non CF	3	11	14

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des résultats du transcriptome et du miRNOME

Nous avons utilisé nos compétences en bio-informatiques pour analyser les données brutes issues du miRNOME et du transcriptome. Nous avons utilisé les cinq bases de données les plus courantes : TargetScan, PicTar, miRBase, miRANDA et miRDB. Le recouplement des données bio-informatiques et la veille bibliographique (Figure 51) nous ont permis de mettre en évidence la dérégulation de deux miARN principaux (miR-199 et miR-636) qui participent à la dérégulation de plus de la moitié des 37 gènes dérégulés dans le transcriptome dont une bonne proportion est impliquée dans les phénomènes inflammatoires (chémokines, récepteurs de cytokines, facteurs de transcription...).

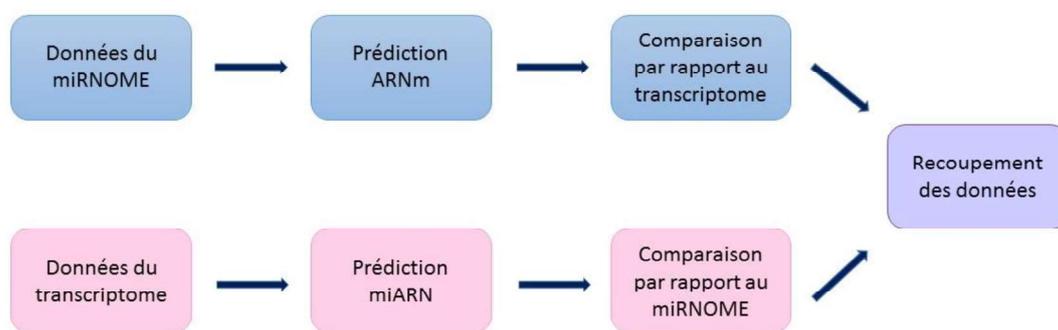


Figure 51 : Schéma récapitulatif d'analyse des données issues du miRNOME et du transcriptome.

Par la suite, nous nous sommes intéressés au miR-199a qui a déjà été décrit comme régulant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans la littérature. De plus, d'après les bases de données bio-informatiques, ce miARN régulerait plus de la moitié des gènes dérégulés dans le transcriptome.

### 2.4.1. Matériel et méthodes

Les lignées cellulaires épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o<sup>+</sup>) et CF (CFBE41o<sup>+</sup>) sont fournies par le Dr. Gruenert, San Francisco, USA. Les cellules sont cultivées en incubateur humidifié à 37°C et sous atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu essentiel minimum (MEM) supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) 10% et en pénicilline-streptomycine (100 U/ml). Nous avons transfecté les cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o<sup>+</sup>) avec un mimic de

miR-199a (hsa-miR-199-3p) ou un contrôle inhibiteur négatif (Life Technologie) 48h avec l'agent de transfection HiPerfect (Qiagen).

Les miARN et ARN sont extraits à l'aide du kit *Nucleospin miRNA* (Macherey-Nagel, Hoerd, France) selon le protocole fourni dans un volume d'élution final de 30 µL. La concentration et la qualité des miARN et ARN sont déterminées par Nanodrop. L'obtention d'ADNc se fait à partir de 20 ng des miARN totaux, à l'aide du kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit* (Life Technologie) selon le protocole fourni par le kit, dans un volume réactionnel de 15 µL. L'obtention d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des cellules en culture, se fait à partir de 1 µg des ARN totaux, à l'aide du kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Life Technologie) selon le protocole fourni, avec un volume réactionnel final de 20 µL.

L'expression des transcrits est mesurée par qPCR en utilisant des sondes Taqman miR-199a (002304) et RNU6B (001093) (Life Technologies). L'expression des miARN est normalisée par l'expression du RNU6B. La qPCR est réalisée en triplicat. 1 µL d'ADNc est mis en présence de *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix 2X* (Life Technologies) dans un volume réactionnel final de 10 µL. Les qPCR sont effectuées avec le thermocycler Applied Biosystems StepOnePlus.

Afin d'étudier la liaison du miR-199a à IKKβ, nous avons transfecté les cellules CFBE410<sup>-</sup> avec un plasmide luciférase couplé au 3'UTR d'IKKβ : luc-IKKβ (pEZX-MT05, Genecopoeia, USA) grâce à l'agent de transfection ExGen500 (Euromedex) en présence du mimic du miR-199a ou du contrôle (30 nM). Après 48 h de transfection, la luminescence a été mesurée en utilisant le kit *Secret-Pair Dual Luminescence Assay Kit* (Genecopoeia). Deux activités de chimioluminescence sont mesurées : la luciférase Gaussia, une protéine enzymatique sécrétée qui émet de la luminescence par oxydation de la luciférine, et la phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée (SEAP), protéine extrêmement stable utilisée comme rapporteur endogène.

48h après la transfection avec le contrôle ou le mimic du miR-199a, les cellules CFBE410<sup>-</sup> sont rincées avec du PBS puis les protéines sont extraites grâce à un tampon de lyse contenant de l'EDTA, du NaCl, du SDS, du NP-40, du DTT et des cocktails anti-protéases. La concentration en protéines totales est évaluée avec un fluoromètre de type *Qubit*

(ThermoFischer, France). 20 µg de protéines sont solubilisés dans du tampon Laemmli 4 X supplémenté en β-mercaptoéthanol 5 %, puis chauffés pendant cinq minutes à 95 °C. Les protéines sont séparées sur gel SDS-PAGE (10 % en bis-acrylamide) pendant 1h30 à 125 V. Le transfert est réalisé sur membrane de nitrocellulose (BioRad, Paris, France) pendant sept minutes (system de transfert iBlot™, Invitrogen). Les anticorps et les dilutions (dans du lait) utilisés par la suite sont les suivants : lapin anti-IKKβ humain (1/1 000<sup>ème</sup>), lapin anti-NF-κB humain (1/1 000<sup>ème</sup>), souris anti-phospho IκBα humain (1/1 000<sup>ème</sup>), souris anti-β actine humaine (1/20 000<sup>ème</sup>). Les bandes spécifiques sont visualisées par la technique de chimioluminescence par une caméra de révélation (Chemidoc, BioRad, France).

L'IL-8 a été dosée par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dans les surnageants de culture des cellules CFBE41o<sup>-</sup> 48h après la transfection avec le contrôle ou le mimic du miR-199a.

#### 2.4.2. Expressions du miR-199a et des acteurs de la voie NF-κB

Les résultats du miRNOME nous ont montré une expression du miR-199a significativement plus faible dans les cellules épithéliales bronchiques CF cultivées en interface air-liquide par rapport aux cellules non CF. Dans un premier temps, nous avons vérifié si nous obtenons les mêmes résultats dans des lignées cellulaires épithéliales bronchiques CF *versus* non CF.

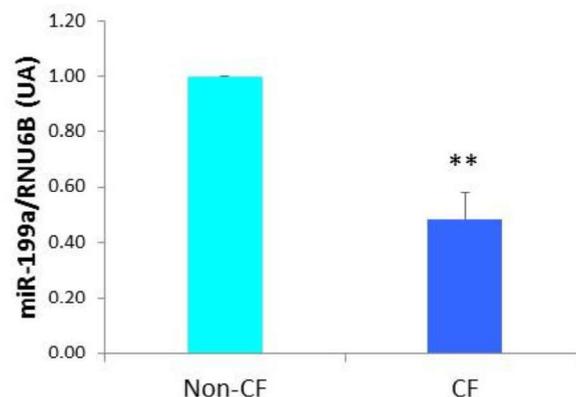
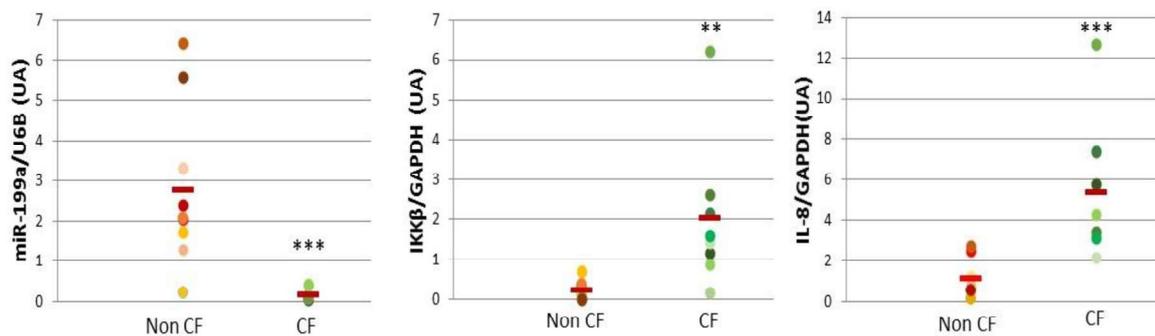


Figure 52 : Expression de miR-199a dans les cellules CF et non CF. Quantification de l'expression de miR-199a rapportée au RNU6B dans les cellules épithéliales bronchiques non CF (16HBE14o<sup>-</sup>) et CF (CFBE41o<sup>-</sup>).

Les résultats présentés sur la Figure 52 confirment les résultats du miRNOME. L'expression du miR-199a est significativement plus faible dans les cellules CF par rapport aux cellules non CF. Le miR-199a est prédit et a déjà été montré comme régulant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans la littérature. Ainsi, dans le but de caractériser l'association entre le miR-199a et les protéines impliquées dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, nous avons quantifié l'expression *ex vivo* dans des explants bronchiques du miR-199a, d'IKK $\beta$  et de l'IL-8 par RT-qPCR.



**Figure 53 : Expression du miR-199a, d'IKK $\beta$  et de l'IL-8 dans des explants bronchiques CF et non CF.** Les RT-qPCR ont été effectuées à partir de 8 explants CF et 9 explants non CF. Les résultats sont normalisés par le RNU6B pour le miR-199a et par la GAPDH pour IKK $\beta$  et IL-8.

Dans les explants bronchiques issus de patients CF, on observe une sous-expression significative du miR-199a et une surexpression d'IKK $\beta$  et de l'IL-8 par rapport aux explants bronchiques non CF (Figure 53).

Le test statistique de Pearson réalisé sur les données issues des explants CF nous indique qu'il existe une corrélation statistique entre les niveaux d'expression du miR-199a et d'IKK $\beta$  (Figure 54).

p-values / Groupe Pathologie-CF :

Variables	IL-8	IKK $\beta$
miR-199a-3p	0,115	<b>0,005</b>
IKK $\beta$	0,151	

**Figure 54 : Matrice de corrélation statistique de Pearson avec les valeurs de p dans les explants bronchiques CF.**

Cette corrélation positive nous a amenés à étudier la régulation d'IKK $\beta$  par miR-199a dans le contexte CF.

### 2.4.3. Régulation d'IKK $\beta$ par le miR-199a

Afin d'étudier la régulation d'IKK $\beta$  par le miR-199a, nous avons transfecté la lignée cellulaire épithéliale bronchique CF CFBE41o<sup>-</sup> avec un mimic du miR-199a.

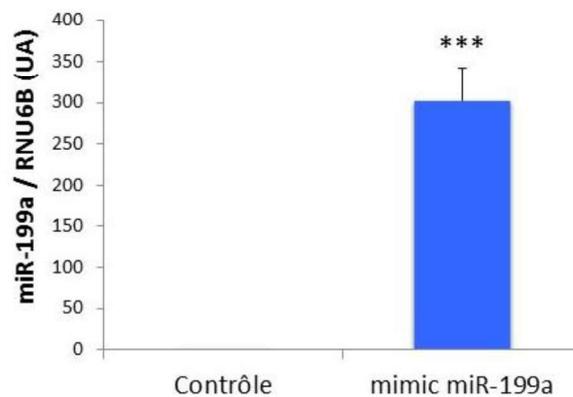
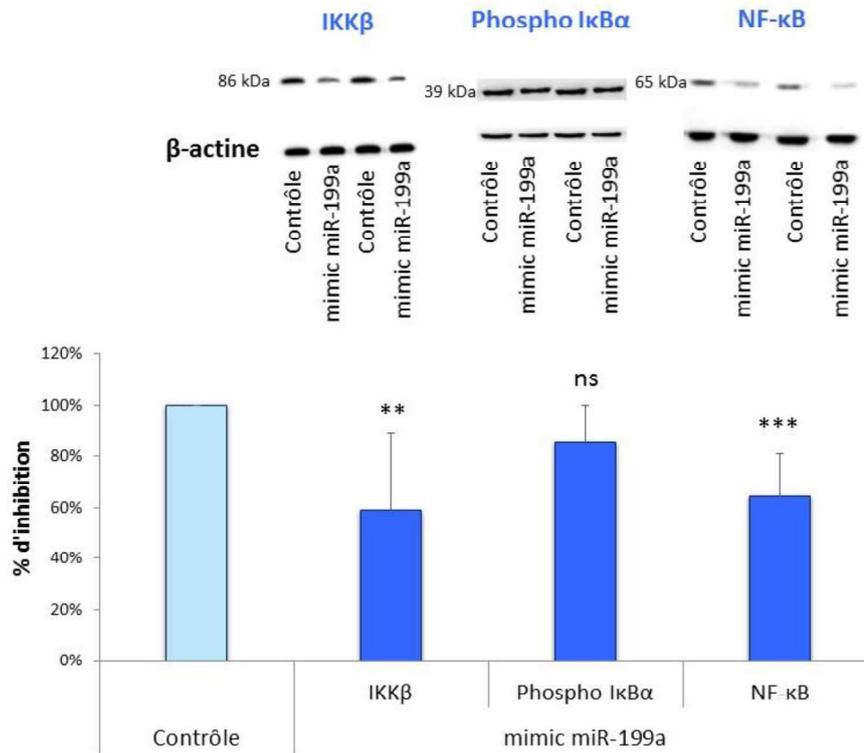


Figure 55 : Transfection du mimic de miR-199a.

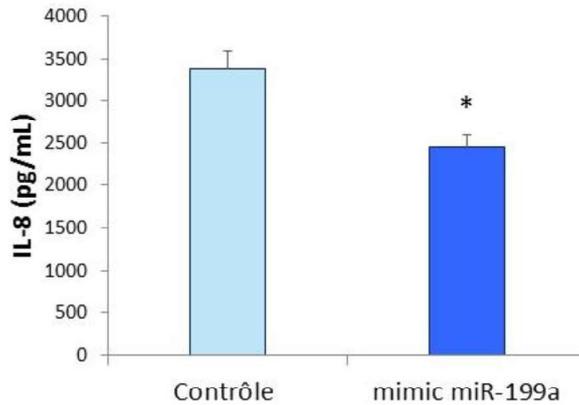
Quantification de l'expression de miR-199a rapportée au RNU6B dans les cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o<sup>-</sup>) transfectées avec un mimic de miR-199a ou un contrôle négatif pendant 48h.

Après avoir validé l'efficacité de la transfection (Figure 55), nous avons quantifié l'expression protéique de différents acteurs de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans les cellules transfectées.



**Figure 56 : Effet du miR-199a sur l'expression protéique d'IKKβ, de phospho IκBα et de NF-κB.**  
 Quantification de l'expression protéique d'IKKβ, de phospho IκBα et de NF-κB rapportée à la β-actine dans les cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE41o) transfectées avec un mimic de miR-199a ou un contrôle négatif pendant 48h.

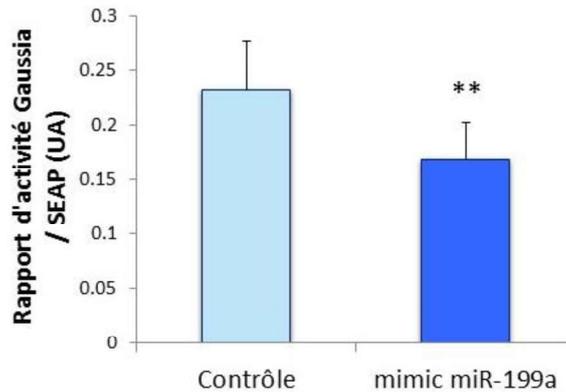
Les résultats présentés sur la Figure 56 montrent que la surexpression du miR-199a dans les cellules CF induit une diminution significative d'IKKβ, de NF-κB ainsi qu'une tendance à la diminution de l'expression de phospho IκBα (forme dégradée qui permet la libération de NF-κB et l'activation de la voie de signalisation NF-κB) par rapport aux cellules transfectées avec le contrôle. Nous nous sommes donc intéressés à l'IL-8, chimiokine sécrétée sous la dépendance du facteur de transcription NF-κB.



**Figure 57 : Effet du miR-199a sur la sécrétion d'IL-8.**

Des cellules épithéliales bronchiques CFBE410<sup>o</sup> ont été transfectées avec un contrôle négatif ou un mimic du miR-199a, l'IL-8 est dosée par ELISA dans les surnageants des cellules 48h après la transfection.

Les résultats présentés sur la Figure 57 nous montrent que la surexpression du miR-199a dans les cellules CF entraîne une diminution significative de la sécrétion en IL-8 par rapport à la condition contrôle. Nous nous sommes alors demandés si le lien entre le miR-199a et la voie de signalisation NF- $\kappa$ B était un lien direct. Nous avons donc transfecté nos cellules avec un plasmide luciférase couplé au 3'UTR d'IKK $\beta$ .



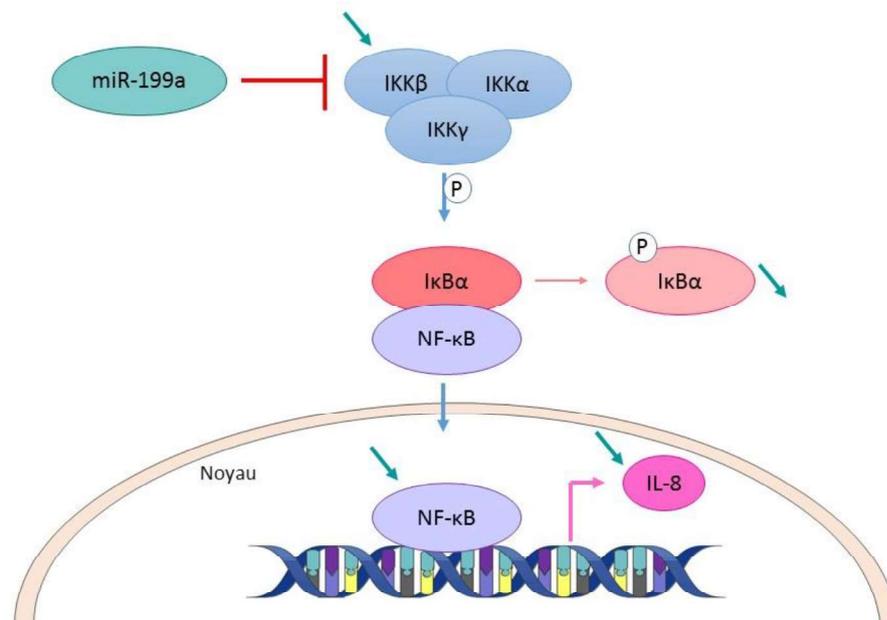
**Figure 58 : miR-199a régule directement IKK $\beta$ .**

Des cellules épithéliales bronchiques CFBE410<sup>o</sup> ont été co-transfectées avec un contrôle négatif ou un mimic du miR-199a et un plasmide luciférase-3'UTR d'IKK $\beta$ . L'activité luciférase est dosée dans le surnageant des cellules 48h après la transfection.

L'activité luciférase diminue significativement lorsque miR-199a est surexprimé par rapport à la condition contrôle. Nous en concluons donc que miR-199a régule directement IKK $\beta$ .

#### 2.4.4. Conclusions

Dans cette dernière partie, nous avons mis pu montrer la dérégulation du miR-199a dans le contexte CF. Ce miARN est sous-exprimé dans les cellules CF par rapport aux cellules non CF. Nous avons également montré qu'il existait un lien entre ce miARN et la voie NF- $\kappa$ B. Le miR-199a régule directement IKK $\beta$  en se liant à son 3'UTR entraînant une diminution de l'expression de la cascade de signalisation NF- $\kappa$ B avec une diminution de l'expression d'IKK $\beta$ , de NF- $\kappa$ B et de la sécrétion en IL-8 (Figure 59).



**Figure 59 : Régulation de la voie NF- $\kappa$ B par le miR-199a.**  
Le miR-199a régule directement IKK $\beta$  entraînant une diminution de son expression, de l'expression d'I $\kappa$ B $\alpha$ , de NF- $\kappa$ B et de l'IL-8.

# Discussion

Au niveau pulmonaire, chez les patients atteints de mucoviscidose, la déficience de CFTR est responsable de plusieurs évènements menant à long terme à la destruction de l'épithélium pulmonaire et à l'insuffisance respiratoire. L'émergence de nouvelles thérapies protéiques visant à restaurer CFTR *via* les molécules de la société Vertex ne montre pas d'effet majeur au niveau pulmonaire chez la majorité des patients CF. A ce jour, il n'existe donc pas de traitement curatif pour les patients. L'identification en 2008 du canal chlorure calcium dépendant ANO1 et son implication dans des paramètres dérégulés chez les patients atteints de mucoviscidose tels que la sécrétion de mucines, la sécrétion de bicarbonates ou l'inflammation font de ce canal une cible thérapeutique particulièrement intéressante. Des travaux précédents de notre laboratoire ont montré une dérégulation de l'activité de canal chlorure et de l'expression d'ANO1 dans des modèles pulmonaires CF ainsi que son implication dans les processus de migration et prolifération cellulaire. Ces nouvelles données appuient l'intérêt thérapeutique de ce canal.

Nos objectifs étaient de comprendre la régulation du canal ANO1 par les miARN afin de proposer une stratégie thérapeutique innovante pour les patients CF.

### **Régulation d'ANO1 par les miARN : bases de données bio-informatiques**

Nous nous sommes dans un premier temps reportés à des bases de données bio-informatiques afin d'identifier les miARN prédits pour cibler ANO1. Quatre miARN étaient fortement prédits pour réguler ANO1 : les miARN 9, 19a, 19b et 144. Nos expériences ont démontré que parmi ces miARN, seul miR-9 régule directement ANO1. Après avoir effectué des expériences *in vitro*, nous avons montré que les miR-19a et miR-19b ne régulent pas ANO1 et miR-144 régule ANO1 indirectement. Certaines études ont montré que le miR-144 régule directement CFTR en se fixant à son 3'UTR. Il serait alors possible que ce miARN régule ANO1 *via* CFTR. Une étude antérieure avait déjà montré qu'il existait une co-localisation entre CFTR et ANO1 sans que le lien entre les deux canaux ne soit véritablement établi (Ousingsawat et al. 2011). Les résultats que nous avons obtenus confirment que les analyses *in silico* basées sur des algorithmes différents doivent être validées biologiquement (Sonneville et al. 2015). Une étude dans le contexte CF avait déjà fait ce constat : sur trois miARN prédits pour cibler CFTR, seuls deux le régulent (Hassan et al.

2012). Par ailleurs, certaines études ont montré une régulation de CFTR par les miARN de façon synergique plus élevée que par un miARN de façon individuelle (Megiorni et al. 2011, Oglesby et al. 2013). Megiorni *et al.* montre, par exemple, une diminution de l'activité luciférase de 50% par rapport à la condition contrôle, en utilisant un miARN mature (miR-101) prédit pour cibler CFTR ; cette diminution atteint 80% lorsque deux miARN matures (miR-101 et miR-494) sont utilisés en même temps (Megiorni et al. 2011). Dans notre étude, lorsque nous utilisons un mimic de miR-9, nous obtenons une diminution de 60% de l'expression en ARNm d'ANO1, il pourrait être intéressant de combiner des mimics de miR-9 et miR-144 pour voir si l'effet est d'autant plus important. Il pourrait également être intéressant d'ajouter des mimics de miR-9 et d'autres miARN ayant été montrés comme régulant CFTR.

### **Expression de miR-9**

Nous avons mis en évidence une surexpression de miR-9 dans des lignées de cellules épithéliales bronchiques CF (CFBE410<sup>c</sup>) par rapport à des cellules non CF (16HBE140<sup>c</sup>). Nous n'avons pas confirmé cette surexpression de miR-9 dans d'autres modèles CF (explants bronchiques et plasma). Concernant les explants bronchiques, plusieurs hypothèses peuvent expliquer la forte variabilité observée, hormis l'existence d'une variabilité inter-individuelle, reflet d'une hétérogénéité génétique d'une population donnée. Nous sommes, de plus, en présence d'une population cellulaire hétérogène dans les explants bronchiques (cellules ciliées, à mucus, basales, etc). Notre interrogation principale porte sur la valeur des biopsies « contrôles ». En effet, pour ces dernières, nous avons accès à des prélèvements issus de biopsies de zones parfaitement saines d'un point de vue histopathologique de patients atteints de cancer du poumon, mais qui n'excluent pas une inflammation localisée. En ce qui concerne les prélèvements humains CF, issus d'explants pulmonaires de patients qui vont être transplantés, nous sommes en présence de poumons très infectieux (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*...) mais également très inflammatoires. De plus, ces patients sont traités avec de fortes doses d'antibiotiques et de corticoïdes, pour limiter les exacerbations mais également de différents autres traitements comme des DNases, des vitamines... Ces multiples paramètres ont une influence connue sur l'expression des gènes mais pourraient également réguler les miARN. En effet, une étude récente a, par exemple,

démontré qu'un traitement à long terme à la rapamycine entraînait une reprogrammation de l'expression de certains miARN (Totary-Jain et al. 2013). Il a également été montré qu'une infection bactérienne par *Staphylococcus aureus* ou une augmentation de l'expression de certaines cytokines, augmentait les niveaux d'expression de certains miARN (Ramachandran et al. 2013). En ce qui concerne la mesure de l'expression de miR-9 dans le plasma, nous n'observons pas de différence significative de son expression entre les plasmas CF et non CF. Comme pour les explants bronchiques, il existe une grande variabilité interindividuelle présente.

### **Régulation de miR-9**

Nous nous sommes alors interrogés sur les raisons de la dérégulation de l'expression de miR-9 dans les cellules CF. Nous avons donc testé l'effet de l'IL-4 ainsi que l'effet de CFTR sur l'expression de miR-9. Nous nous sommes intéressés à l'effet de l'IL-4 car les travaux de l'équipe de Galietta ont montré que cette cytokine régule ANO1. De manière plus précise, les auteurs ont montré qu'une stimulation de cellules épithéliales bronchiques avec de l'IL-4 avait pour conséquence une augmentation de l'expression d'ANO1. Nous avons donc stimulé la lignée cellulaire épithéliale bronchique CF CBE410<sup>-</sup> avec de l'IL-4 mais nous n'avons pas observé de différence de l'expression de miR-9. La régulation d'ANO1 par miR-9 est indépendante de l'IL-4, ce qui implique l'existence d'autres systèmes de régulation qu'il reste à déterminer.

Nous avons alors vérifié si la surexpression de miR-9 pouvait être directement liée au défaut de CFTR. Nous avons donc mesuré l'expression de miR-9 après avoir, par plusieurs approches, modulé l'expression ou l'activité de canal Cl<sup>-</sup> de CFTR. Afin d'augmenter l'expression de CFTR à la membrane des cellules épithéliales bronchiques CF, nous les avons cultivé à basse température (27°C). Cette technique permet l'adressage à la membrane des protéines CFTR mal repliées et accumulées dans le réticulum endoplasmique dans l'attente d'être dégradées (Denning et al. 1992). Nous avons ensuite inhibé la conductance Cl<sup>-</sup> de CFTR en utilisant un inhibiteur spécifique de cette protéine dans des cellules non CF (16HBE14o-). Cet inhibiteur de CFTR (CFTR-inh172) entraîne une inhibition de la fonction d'activité canal de CFTR mais n'altère ni sa structure ni sa localisation au niveau

membranaire. Nous n'observons pas de différence significative de l'expression de miR-9 lorsque nous cultivons les cellules CF à basse température. Le ré-adressage à la membrane d'une protéine CFTR mutée ne semble donc pas influencer sur l'expression de miR-9. En revanche, nous observons une tendance à l'augmentation de l'expression de miR-9 lorsque nous inhibons la conductance Cl<sup>-</sup> de CFTR dans des cellules non CF. Ces résultats sont à confirmer.

Dans le contexte de la mucoviscidose, une autre équipe s'est intéressée aux causes de la surexpression d'un miARN, le miR-155, dans les cellules CF. Les auteurs ont mis en évidence une altération dans la biogénèse de ce miARN. En effet, alors que le miARN mature est surexprimé dans les cellules CF, une sous-expression du pri-miR-155 est observée dans les cellules CF. Les auteurs ont alors montré que la surexpression du miR-155 était médiée par les protéines TTP (tristetrapoline) et KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) qui agissent sur la biogénèse du miR-155. Il serait intéressant de regarder dans nos cellules les niveaux de pre-miR-9 et pri-miR-9 pour voir s'il existe une dérégulation de la biogénèse de miR-9.

### **Nouvelle stratégie thérapeutique : le TSB ANO1**

Nous avons mis en évidence une surexpression de miR-9 dans les cellules CF ainsi qu'une régulation d'ANO1 par miR-9 entraînant une diminution d'expression et d'activité d'ANO1. Il nous est alors paru intéressant de pouvoir contrer cette régulation, nous avons donc fait synthétiser une molécule, un *target site blocker* qui va se fixer au 3'UTR d'ANO1 (TSB ANO1) et empêcher la fixation de miR-9 à ce dernier. Lorsque nous transfectons la lignée cellulaire épithéliale bronchique CFBE410<sup>o</sup> mais également des cultures primaires différenciées et cultivées en interface air-liquide issues de patients CF avec le TSB ANO1, nous avons pu observer une augmentation de l'expression protéique d'ANO1, de l'activité chlorure liée à ANO1 et de la vitesse de migration cellulaire. Il est intéressant de noter que lorsque des cellules CF sont transfectées avec le TSB ANO1, nous observons une activité chlorure liée à ANO1 semblable à celle de cellules non CF. De plus, nous avons donné le TSB ANO1 par instillations intranasales à des souris CF (homozygotes pour la mutation F508del) et nous avons observé une augmentation significative de l'activité chlorure liée à ANO1 dans la trachée des souris CF ayant reçu le TSB ANO1. Enfin, nous nous sommes intéressés à la

clairance mucociliaire et nous avons montré une augmentation de la vitesse du battement ciliaire lorsque les cultures primaires CF sont transfectées avec le TSB ANO1. Il serait intéressant d'étudier les propriétés rhéologiques du mucus ainsi que sa composition en présence du TSB ANO1.

Nos résultats montrent donc que le TSB ANO1 restaure de nombreux paramètres dérégulés dans le contexte de la mucoviscidose et semble donc être une cible thérapeutique pertinente. Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet international par Inserm Transfert le 03 Juillet 2015 (n°PCT/FR2015/051850) et sont actuellement en cours de valorisation par Inserm Transfert et la SATT Lutech. Nous recevons également des conseils de Kurma Partners, un fond d'investissement d'avenir spécialiste du financement de l'innovation en santé, et du comité stratégique de l'association Vaincre La Mucoviscidose pour établir le programme de maturation de nos travaux.

De nombreuses études suggèrent qu'ANO1 serait une bonne cible thérapeutique chez le patient CF. Les souris KO pour CFTR ne présentent pas ou très peu de phénotype pulmonaire grâce à la compensation d'autres canaux. Ces observations suggèrent que l'activation d'une sécrétion chlorure indépendante de CFTR pourrait être une stratégie thérapeutique prometteuse dans le contexte CF (Gianotti et al. 2016). De plus, de façon théorique, tous les patients CF pourraient bénéficier de ce type d'approche en étant indépendant du génotype de CFTR. Il pourrait être intéressant de regarder s'il existe une corrélation entre la sévérité de la maladie et des polymorphismes présents dans le 3'UTR d'ANO1 au site de fixation de miR-9 chez les patients.

### **Mode d'administration du TSB ANO1**

Nous avons testé l'efficacité de notre TSB *in vivo* chez des souris CF par instillation intranasale. Nous avons observé une augmentation significative de 48% de l'activité chlorure liée à ANO1 dans la trachée des souris CF auxquelles nous avons instillé le TSB ANO1. D'un point de vue anatomique des tissus, la trachée de la souris ressemble aux bronches humaines. Il a par exemple été montré que les glandes sous-muqueuses étaient présentes et abondantes dans la trachée des souris (Janowski et al. 2007, Bonvin et al. 2008). Nous avons donné notre molécule par instillation intranasale, si la molécule est développée chez le

patient, l'inhalation nous semble être la meilleure façon d'administrer le TSB ANO1. En effet, c'est l'atteinte pulmonaire qui prédomine chez les patients CF et d'autre part l'inhalation est tissu-spécifique et présente donc une exposition systémique moindre, diminuant ainsi le risque d'effets secondaires. Cependant, les poumons de patients CF présentent des barrières anatomiques à l'inhalation comme l'obstruction des voies aériennes par le mucus. Dans le but de développer une thérapeutique du TSB ANO1 par inhalation, les prochaines étapes seraient d'évaluer l'efficacité de ce dernier dans des cultures de cellules cultivées en interface air-liquide produisant du mucus afin d'étudier le passage du TSB ANO1 à travers le mucus. Il serait également important d'étudier l'efficacité du TSB ANO1 dans ces cultures dans le but de vérifier qu'il n'est pas dégradé.

Nous nous interrogeons de plus sur le mode d'administration du TSB ANO1. Chez les patients CF, l'atteinte respiratoire prédomine mais il existe d'autres atteintes liées à la déficience de CFTR telles que l'atteinte pancréatique et digestive ou l'atteinte osseuse qui participent à la comorbidité. De plus, les molécules de la société Vertex données en systémique ont montré une amélioration du patient sur le plan général avec une amélioration de la qualité de vie (Mayer 2016). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de notre TSB ANO1 sur d'autres modèles et nous avons pu observer une augmentation significative des efflux chlorures liés à ANO1 dans un modèle de lignée cellulaire glandulaire bronchique qui expriment fortement CFTR et qui ont un rôle majeur dans la sécrétion de mucus (KM4) et dans un modèle de lignée cellulaire épithéliale pancréatique CF (CFPAC1). Un mode d'administration systémique pourrait ainsi être envisagé. Une collaboration avec les Dr Frédéric Velard et Jacky Jacquot (EA 4691 BIOS : Biomatériaux et inflammation en site osseux, Reims) est actuellement en cours pour observer les effets du TSB ANO1 sur la régénération osseuse.

### **Dégradation du TSB**

Le temps de demi-vie est l'un des paramètres les plus importants pour aller vers l'étude clinique. L'étude clinique du Denufosol® a échoué en partie en raison du manque de stabilité de la molécule avec une demi-vie de trois heures dans l'épithélium nasal, dix-sept minutes dans les poumons de patients CF et quelques secondes dans le sang. Pour éviter ce problème, une molécule LNA (*locked nucleic acid*) et des groupements phosphorothioates

ont été ajoutés au TSB ANO1, ce qui permet d'augmenter sa stabilité et sa perméabilité au niveau des membranes plasmiques. Nos expériences *in vitro* ont montré que nous avons toujours un effet sur la clairance mucociliaire trente jours après la transfection de cultures primaires de cellules différenciées en interface air-liquide. *In vivo*, nous avons observé une augmentation significative des efflux chlorures liés à ANO1 sept jours après la dernière instillation intranasale. Nous avons, de plus, effectué des expériences pour tester la dégradation du TSB ANO1 en incubant notre molécule sept jours à 37°C en présence d'expectoration, de plasma et de DNase. Nous n'avons pas observé de dégradation du TSB ANO1 dans ces conditions mais il serait intéressant de tester l'effet du TSB ANO1 sur ANO1 après ces incubations. Le Miravirsen® est une molécule possédant la technologie LNA qui est actuellement en cours d'essais cliniques pour le traitement du virus de l'hépatite C (Lindow and Kauppinen 2012). Le Miravirsen® séquestre spécifiquement le miR-122 qui se lie au 5'UTR de l'ARNm HCV et promeut sa réplication. Le traitement par le miravirsen mène à une diminution prolongée de la réplication du HCV sans preuve de résistance virale ou d'effets secondaires chez des chimpanzés traités. De plus, le miravirsen est détecté par northern-blot jusqu'à huit semaines après la dernière dose injectée (Lanford et al. 2010). L'étude clinique de phase IIa menée chez les patients a montré une diminution prolongée et dose-dépendante des niveaux d'ARN du HCV, de la cholestérolémie et une modification de l'expression d'une centaine de gènes dans le foie (Janssen et al. 2013). Les auteurs ont de plus montré que la diminution plasmatique du miR-122 est toujours observée deux mois après la dernière injection de miravirsen, ce qui peut être expliqué par la longue demi-vie du miravirsen dans les tissus (environ 30 jours) (van der Ree et al. 2016). Le succès du miravirsen est encourageant pour le transfert de notre étude fondamentale vers de futures applications cliniques.

### **miRNOME – Transcriptome**

Dans une seconde approche, de façon générale, nous avons extrait les ARN et miARN issus de cultures primaires de patients CF et non CF de cellules épithéliales bronchiques différenciées en interface air-liquide. Nous avons ensuite confié les ARN et miARN à des plateformes de séquençage. Les résultats du transcriptome ont montré une expression différentielle des ARN peu différente entre les cellules CF et non CF. 37 gènes sont dérégulés

entre les deux types de cellules. De la même façon, les résultats du miRNOME ont montré 14 miARN différemment exprimés entre les cellules CF et non CF. Nous expliquons cette faible différence d'expression par l'état quiescent des cellules qui sont peu prolifératives et qui ont été cultivées dans un contexte non-infectieux ou inflammatoire. De plus, la première source de variation dans nos échantillons provient de la différence inter-individuelle des échantillons non CF. Parmi les miARN différentiellement exprimés, un miARN, le miR-199a a retenu notre attention. En effet, ce miARN est prédit dans les bases de données pour réguler la moitié des gènes dérégulés dans notre transcriptome. De plus, il a été montré dans la littérature que ce miARN participe à la régulation de la voie NF- $\kappa$ B, voie dérégulée dans le contexte de la mucoviscidose.

### **Régulation de la voie NF- $\kappa$ B par le miR-199a**

Nous avons mis en évidence une sous-expression de l'expression du miR-199a dans les cellules CF par rapport aux cellules non CF, ce qui est en accord avec les résultats issus du miRNOME. Dans des explants bronchiques *ex vivo*, nous avons montré une corrélation significative entre l'expression du miR-199a et d'IKK $\beta$ . Ces données nous ont conforté dans l'idée que le miR-199a pourrait être un régulateur important de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B au niveau des voies aériennes des patients CF. Nous avons donc testé cette hypothèse dans la lignée de cellules épithéliales bronchiques CF CFBE41o- et nous avons pu montrer que la surexpression du miR-199a entraînait une diminution de l'expression des protéines IKK $\beta$  et NF- $\kappa$ B, ainsi qu'une diminution de la sécrétion en IL-8 suggérant l'implication du miR-199a dans la régulation de la voie NF- $\kappa$ B. Nous avons alors montré que le miR-199a régule directement IKK $\beta$  en se fixant à son 3'UTR. Ces travaux mettent donc en évidence un nouveau système de régulation via les miARN qui pourrait expliquer en partie l'inflammation exacerbée retrouvée au niveau pulmonaire chez les patients CF. L'origine de la dérégulation du miR-199a est inconnue, il serait intéressant d'étudier l'expression de miR-199a dans un contexte inflammatoire provoqué par un stimulus. Pour cela, nous pourrions traiter les cellules CF avec de l'IL-1 $\beta$  et/ou du TNF- $\alpha$  et quantifier ensuite l'expression du miR-199a.

Par ailleurs, il a été montré dans d'autres pathologies que miR-9 cible directement le 3'UTR de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B (NFKB1) et que l'expression de miR-9 est augmentée lorsque

la voie NF- $\kappa$ B-MyD88 dépendante est activée (Bazzoni et al. 2009, Guo et al. 2009). Dans la mucoviscidose, la voie NF- $\kappa$ B est suractivée, et pourrait donc conduire à la surexpression de miR-9 qui tenterait de compenser cette hyperactivité en diminuant la synthèse de NFKB1. Il serait intéressant d'étudier la boucle miR-9/miR-199a/NF- $\kappa$ B.

Enfin, il serait intéressant de tester l'effet du celecoxib (anti-inflammatoire non stéroïdien) sur l'expression du miR-199a et de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans notre modèle cellulaire. En effet, une étude récente dans des macrophages murins et humains CF a montré que cette molécule protégeait d'une hyper-inflammation pulmonaire suite à une stimulation par du LPS grâce à l'activation de l'axe Akt/miR-199a/caveoline-1 (Zhang et al. 2015).

En conclusion, notre étude nous a permis de montrer que les diminutions d'expression et d'activité du canal chlorure ANO1 dans le contexte CF étaient dues à la surexpression de miR-9 dans les cellules CF, ce miARN régulant directement ANO1 en se liant à son 3'UTR. Nous avons alors fait synthétiser une molécule capable de se fixer spécifiquement au 3'UTR d'ANO1 et d'empêcher la fixation de miR-9 à ce dernier : le TSB ANO1. Nos résultats ont montré que le TSB ANO1 est capable de restaurer de nombreux paramètres dérégulés dans le contexte CF tels que : l'expression d'ANO1, l'activité chlorure liée à ANO1, la migration cellulaire et le battement ciliaire. De plus, nous avons donné le TSB ANO1 à des souris CF et avons pu observer une augmentation de l'activité chlorure liée à ANO1 dans la trachée de ces souris. Le TSB ANO1 est couplé à des groupements phosphorothioates et une base LNA afin d'augmenter sa spécificité, sa perméabilité cellulaire et sa stabilité dans les fluides biologiques. Nous observons toujours un effet du TSB ANO1 trente jours après sa transfection dans nos cellules et aucune dégradation du TSB ANO1 dans différents fluides biologiques à 37°C. Notre stratégie alternative pour compenser la déficience de CFTR peut donc être considérée comme une approche thérapeutique intéressante pour les patients CF.

## **Références bibliographiques**

Alton, E. W., D. K. Armstrong, D. Ashby, K. J. Bayfield, D. Bilton, E. V. Bloomfield, A. C. Boyd, J. Brand, R. Buchan, R. Calcedo, P. Carvelli, M. Chan, S. H. Cheng, D. D. Collie, S. Cunningham, H. E. Davidson, G. Davies, J. C. Davies, L. A. Davies, M. H. Dewar, A. Doherty, J. Donovan, N. S. Dwyer, H. I. Elgmati, R. F. Featherstone, J. Gavino, S. Gea-Sorli, D. M. Geddes, J. S. Gibson, D. R. Gill, A. P. Greening, U. Griesenbach, D. M. Hansell, K. Harman, T. E. Higgins, S. L. Hodges, S. C. Hyde, L. Hyndman, J. A. Innes, J. Jacob, N. Jones, B. F. Keogh, M. P. Limberis, P. Lloyd-Evans, A. W. Maclean, M. C. Manvell, D. McCormick, M. McGovern, G. McLachlan, C. Meng, M. A. Montero, H. Milligan, L. J. Moyce, G. D. Murray, A. G. Nicholson, T. Osadolor, J. Parra-Leiton, D. J. Porteous, I. A. Pringle, E. K. Punch, K. M. Pytel, A. L. Quittner, G. Rivellini, C. J. Saunders, R. K. Scheule, S. Sheard, N. J. Simmonds, K. Smith, S. N. Smith, N. Soussi, S. Soussi, E. J. Spearing, B. J. Stevenson, S. G. Sumner-Jones, M. Turkkila, R. P. Ureta, M. D. Waller, M. Y. Wasowicz, J. M. Wilson, P. Wolstenholme-Hogg and U. K. C. F. G. T. Consortium (2015). "Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial." Lancet Respir Med **3**(9): 684-691.

Amaral, M. D. (2015). "Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients." J Intern Med **277**(2): 155-166.

Amato, F., M. Seia, S. Giordano, A. Elce, F. Zarrilli, G. Castaldo and R. Tomaiuolo (2013). "Gene mutation in microRNA target sites of CFTR gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis?" PLoS One **8**(3): e60448.

Amato, F., R. Tomaiuolo, F. Nici, N. Borbone, A. Elce, B. Catalanotti, S. D'Errico, C. M. Morgillo, G. De Rosa, L. Mayol, G. Piccialli, G. Oliviero and G. Castaldo (2014). "Exploitation of a very small peptide nucleic acid as a new inhibitor of miR-509-3p involved in the regulation of cystic fibrosis disease-gene expression." Biomed Res Int **2014**: 610718.

Andersen, D. H. and R. G. Hodges (1946). "Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology." Am J Dis Child **72**: 62-80.

Anderson, M. P., R. J. Gregory, S. Thompson, D. W. Souza, S. Paul, R. C. Mulligan, A. E. Smith and M. J. Welsh (1991). "Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity." Science **253**(5016): 202-205.

Arreola, J., T. Begenisich, K. Nehrke, H. V. Nguyen, K. Park, L. Richardson, B. Yang, B. C. Schutte, F. S. Lamb and J. E. Melvin (2002). "Secretion and cell volume regulation by salivary acinar cells from mice lacking expression of the Clcn3 Cl<sup>-</sup> channel gene." J Physiol **545**(Pt 1): 207-216.

Barro-Soria, R., R. Schreiber and K. Kunzelmann (2008). "Bestrophin 1 and 2 are components of the Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> conductance in mouse airways." Biochim Biophys Acta **1783**(10): 1993-2000.

Barry, P. J., B. J. Plant, A. Nair, S. Bicknell, N. J. Simmonds, N. J. Bell, N. T. Shafi, T. Daniels, S. Shelmerdine, I. Felton, C. Gunaratnam, A. M. Jones and A. R. Horsley (2014). "Effects of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who carry the G551D mutation and have severe lung disease." Chest **146**(1): 152-158.

- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-233.
- Baulande, S., A. Criqui and M. Duthieu (2014). "[Circulating miRNAs as a new class of biomedical markers]." Med Sci (Paris) **30**(3): 289-296.
- Bazzoni, F., M. Rossato, M. Fabbri, D. Gaudiosi, M. Mirolo, L. Mori, N. Tamassia, A. Mantovani, M. A. Cassatella and M. Locati (2009). "Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5282-5287.
- Becq, F., M. A. Mall, D. N. Sheppard, M. Conese and O. Zegarra-Moran (2011). "Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside." J Cyst Fibros **10 Suppl 2**: S129-145.
- Berube, K., Z. Prytherch, C. Job and T. Hughes (2010). "Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models." Toxicology **278**(3): 311-318.
- Bhattacharyya, S., N. S. Balakathiresan, C. Dalgard, U. Gutti, D. Armistead, C. Jozwik, M. Srivastava, H. B. Pollard and R. Biswas (2011). "Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8." J Biol Chem **286**(13): 11604-11615.
- Bhattacharyya, S., P. Kumar, M. Tsuchiya, A. Bhattacharyya and R. Biswas (2013). "Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP." Biochem Biophys Res Commun **433**(4): 484-488.
- Blouquit, S., A. Regnier, L. Dannhoffer, C. Fermanian, E. Naline, R. Boucher and T. Chinet (2006). "Ion and fluid transport properties of small airways in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **174**(3): 299-305.
- Bolduc, V., G. Marlow, K. M. Boycott, K. Saleki, H. Inoue, J. Kroon, M. Itakura, Y. Robitaille, L. Parent, F. Baas, K. Mizuta, N. Kamata, I. Richard, W. H. Linssen, I. Mahjneh, M. de Visser, R. Bashir and B. Brais (2010). "Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies." Am J Hum Genet **86**(2): 213-221.
- Bonora, M., L. Riffault, S. Marie, M. Mall, A. Clement and O. Tabary (2011). "Morphological analysis of the trachea and pattern of breathing in betaENaC-Tg mice." Respir Physiol Neurobiol **178**(2): 346-348.
- Bonvin, E., P. Le Rouzic, J. F. Bernaudin, C. H. Cottart, C. Vandebrouck, A. Crie, T. Leal, A. Clement and M. Bonora (2008). "Congenital tracheal malformation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice." J Physiol **586**(13): 3231-3243.
- Boucher, R. C. (2002). "An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease." Adv Drug Deliv Rev **54**(11): 1359-1371.

Boucher, R. C., M. J. Stutts, M. R. Knowles, L. Cantley and J. T. Gatzky (1986). "Na<sup>+</sup> transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation." J Clin Invest **78**(5): 1245-1252.

Britschgi, A., A. Bill, H. Brinkhaus, C. Rothwell, I. Clay, S. Duss, M. Rebhan, P. Raman, C. T. Guy, K. Wetzell, E. George, M. O. Popa, S. Lilley, H. Choudhury, M. Gosling, L. Wang, S. Fitzgerald, J. Borawski, J. Baffoe, M. Labow, L. A. Gaither and M. Bentires-Alj (2013). "Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(11): E1026-1034.

Busch, R. (1990). "On the history of cystic fibrosis." Acta Univ Carol Med (Praha) **36**(1-4): 13-15.

Cai, X., C. H. Hagedorn and B. R. Cullen (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." RNA **10**(12): 1957-1966.

Caputo, A., E. Caci, L. Ferrera, N. Pedemonte, C. Barsanti, E. Sondo, U. Pfeffer, R. Ravazzolo, O. Zegarra-Moran and L. J. Galletta (2008). "TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity." Science **322**(5901): 590-594.

Castranova, V., J. Rabovsky, J. H. Tucker and P. R. Miles (1988). "The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte." Toxicol Appl Pharmacol **93**(3): 472-483.

Chamova, T., L. Florez, V. Guergueltcheva, M. Raycheva, R. Kaneva, H. Lochmuller, L. Kalaydjieva and I. Tournev (2012). "ANO10 c.1150\_1151del is a founder mutation causing autosomal recessive cerebellar ataxia in Roma/Gypsies." J Neurol **259**(5): 906-911.

Charlesworth, G., V. Plagnol, K. M. Holmstrom, J. Bras, U. M. Sheerin, E. Preza, I. Rubio-Agusti, M. Ryten, S. A. Schneider, M. Stamelou, D. Trabzuni, A. Y. Abramov, K. P. Bhatia and N. W. Wood (2012). "Mutations in ANO3 cause dominant craniocervical dystonia: ion channel implicated in pathogenesis." Am J Hum Genet **91**(6): 1041-1050.

Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang and C. Y. Zhang (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." Cell Res **18**(10): 997-1006.

Chen, X., Z. Hu, W. Wang, Y. Ba, L. Ma, C. Zhang, C. Wang, Z. Ren, Y. Zhao, S. Wu, R. Zhuang, Y. Zhang, H. Hu, C. Liu, L. Xu, J. Wang, H. Shen, J. Zhang, K. Zen and C. Y. Zhang (2012). "Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for nonsmall cell lung cancer diagnosis." Int J Cancer **130**(7): 1620-1628.

Cho, H., Y. D. Yang, J. Lee, B. Lee, T. Kim, Y. Jang, S. K. Back, H. S. Na, B. D. Harfe, F. Wang, R. Raouf, J. N. Wood and U. Oh (2012). "The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons." Nat Neurosci **15**(7): 1015-1021.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.

Cook, N. L., T. N. Pereira, P. J. Lewindon, R. W. Shepherd and G. A. Ramm (2015). "Circulating microRNAs as noninvasive diagnostic biomarkers of liver disease in children with cystic fibrosis." J Pediatr Gastroenterol Nutr **60**(2): 247-254.

Corvol, H., J. Taytard, O. Tabary, P. Le Rouzic, L. Guillot and A. Clement (2015). "[Challenges of personalized medicine for cystic fibrosis]." Arch Pediatr **22**(7): 778-786.

Crawford, I., P. C. Maloney, P. L. Zeitlin, W. B. Guggino, S. C. Hyde, H. Turley, K. C. Gatter, A. Harris and C. F. Higgins (1991). "Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9262-9266.

Cross, N. L. (1981). "Initiation of the activation potential by an increase in intracellular calcium in eggs of the frog, *Rana pipiens*." Dev Biol **85**(2): 380-384.

Cunningham, S. A., M. S. Awayda, J. K. Bubiien, Ismailov, II, M. P. Arrate, B. K. Berdiev, D. J. Benos and C. M. Fuller (1995). "Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea." J Biol Chem **270**(52): 31016-31026.

Cutting, G. R. (2005). "Modifier genetics: cystic fibrosis." Annu Rev Genomics Hum Genet **6**: 237-260.

Davies, J. C., C. E. Wainwright, G. J. Canny, M. A. Chilvers, M. S. Howenstine, A. Munck, J. G. Mainz, S. Rodriguez, H. Li, K. Yen, C. L. Ordonez, R. Ahrens and V. X. S. Group (2013). "Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation." Am J Respir Crit Care Med **187**(11): 1219-1225.

Davis, B. N., A. C. Hilyard, G. Lagna and A. Hata (2008). "SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation." Nature **454**(7200): 56-61.

De Boeck, K., A. Munck, S. Walker, A. Faro, P. Hiatt, G. Gilmartin and M. Higgins (2014). "Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation." J Cyst Fibros **13**(6): 674-680.

Denning, G. M., M. P. Anderson, J. F. Amara, J. Marshall, A. E. Smith and M. J. Welsh (1992). "Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive." Nature **358**(6389): 761-764.

Deterding, R. R., L. M. Lavange, J. M. Engels, D. W. Mathews, S. J. Coquillette, A. S. Brody, S. P. Millard and B. W. Ramsey (2007). "Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulized denufosol tetrasodium in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **176**(4): 362-369.

Di Sant'Agnese, P. A., R. C. Darling, G. A. Perera and E. Shea (1953). "Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease." Pediatrics **12**(5): 549-563.

Dibattista, M., A. Amjad, D. K. Maurya, C. Sagheddu, G. Montani, R. Tirindelli and A. Menini (2012). "Calcium-activated chloride channels in the apical region of mouse vomeronasal sensory neurons." J Gen Physiol **140**(1): 3-15.

Dodge, J. A. and D. Turck (2006). "Cystic fibrosis: nutritional consequences and management." Best Pract Res Clin Gastroenterol **20**(3): 531-546.

Duran, C., Z. Qu, A. O. Osunkoya, Y. Cui and H. C. Hartzell (2012). "ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16 Cl<sup>-</sup> channel family are intracellular proteins." Am J Physiol Cell Physiol **302**(3): C482-493.

Dweep, H., C. Sticht and N. Gretz (2013). "In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions." Curr Genomics **14**(2): 127-136.

Eggermont, J. (2004). "Calcium-activated chloride channels: (un)known, (un)loved?" Proc Am Thorac Soc **1**(1): 22-27.

El Hiani, Y. and P. Linsdell (2010). "Changes in accessibility of cytoplasmic substances to the pore associated with activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel." J Biol Chem **285**(42): 32126-32140.

Elmen, J., M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjarn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup and S. Kauppinen (2008). "LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates." Nature **452**(7189): 896-899.

Emerson, J., M. Rosenfeld, S. McNamara, B. Ramsey and R. L. Gibson (2002). "Pseudomonas aeruginosa and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis." Pediatr Pulmonol **34**(2): 91-100.

Endale Ahanda, M. L., T. Bienvenu, I. Sermet-Gaudelus, L. Mazzolini, A. Edelman, R. Zoorob and N. Davezac (2015). "The hsa-miR-125a/hsa-let-7e/hsa-miR-99b cluster is potentially implicated in Cystic Fibrosis pathogenesis." J Cyst Fibros **14**(5): 571-579.

Evans, M. J., R. A. Cox, S. G. Shami and C. G. Plopper (1990). "Junctional adhesion mechanisms in airway basal cells." Am J Respir Cell Mol Biol **3**(4): 341-347.

Evans, M. J. and C. G. Plopper (1988). "The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane." Am Rev Respir Dis **138**(2): 481-483.

Fabbri, E., M. Borgatti, G. Montagner, N. Bianchi, A. Finotti, I. Lampronti, V. Bezzetti, M. C. Dececchi, G. Cabrini and R. Gambari (2014). "Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of proinflammatory responses." Am J Respir Cell Mol Biol **50**(6): 1144-1155.

Fallah, G., T. Romer, S. Detro-Dassen, U. Braam, F. Markwardt and G. Schmalzing (2011). "TMEM16A(a)/anoctamin-1 shares a homodimeric architecture with CLC chloride channels." Mol Cell Proteomics **10**(2): M110 004697.

Fanconi, G. (1936). "Das Coeliakie-syndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien." Wien Med Wchnschr.

Farrell, P. M. (2008). "The prevalence of cystic fibrosis in the European Union." J Cyst Fibros **7**(5): 450-453.

Farriau, J. P., M. Vidailhet, M. L. Briard, V. Belot and J. L. Dhondt (2003). "Neonatal screening for cystic fibrosis: France rises to the challenge." J Inherit Metab Dis **26**(8): 729-744.

Ferrera, L., A. Caputo, I. Ubbi, E. Bussani, O. Zegarra-Moran, R. Ravazzolo, F. Pagani and L. J. Galiotta (2009). "Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing." J Biol Chem **284**(48): 33360-33368.

Ferrera, L., P. Scudieri, E. Sondo, A. Caputo, E. Caci, O. Zegarra-Moran, R. Ravazzolo and L. J. Galiotta (2011). "A minimal isoform of the TMEM16A protein associated with chloride channel activity." Biochim Biophys Acta **1808**(9): 2214-2223.

Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya and N. Sonenberg (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet **9**(2): 102-114.

Flume, P. A., T. G. Liou, D. S. Borowitz, H. Li, K. Yen, C. L. Ordonez and D. E. Geller (2012). "Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation." Chest **142**(3): 718-724.

Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge and D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Res **19**(1): 92-105.

Frings, S., D. Reuter and S. J. Kleene (2000). "Neuronal Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels--homing in on an elusive channel species." Prog Neurobiol **60**(3): 247-289.

Frizzell, R. A., G. Rechkemmer and R. L. Shoemaker (1986). "Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis." Science **233**(4763): 558-560.

Fukuda, T., K. Yamagata, S. Fujiyama, T. Matsumoto, I. Koshida, K. Yoshimura, M. Mihara, M. Naitou, H. Endoh, T. Nakamura, C. Akimoto, Y. Yamamoto, T. Katagiri, C. Foulds, S. Takezawa, H. Kitagawa, K. Takeyama, B. W. O'Malley and S. Kato (2007). "DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs." Nat Cell Biol **9**(5): 604-611.

Gabriel, S. E., L. L. Clarke, R. C. Boucher and M. J. Stutts (1993). "CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship." Nature **363**(6426): 263-268.

Galiotta, L. J., P. Pagesy, C. Folli, E. Caci, L. Romio, B. Costes, E. Nicolis, G. Cabrini, M. Goossens, R. Ravazzolo and O. Zegarra-Moran (2002). "IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium in vitro." J Immunol **168**(2): 839-845.

Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.

Gianotti, A., L. Ferrera, A. R. Philp, E. Caci, O. Zegarra-Moran, L. J. Galiotta and C. A. Flores (2016). "Pharmacological analysis of epithelial chloride secretion mechanisms in adult murine airways." Eur J Pharmacol **781**: 100-108.

Gibson (2002). Respiratory Medicine, Elsevier Science Ltd.

Gilad, S., G. Lithwick-Yanai, I. Barshack, S. Benjamin, I. Krivitsky, T. B. Edmonston, M. Bibbo, C. Thurm, L. Horowitz, Y. Huang, M. Feinmesser, J. S. Hou, B. St Cyr, I. Burnstein, H. Gibori, N. Dromi, M. Sanden, M. Kushnir and R. Aharonov (2012). "Classification of the four main types of lung cancer using a microRNA-based diagnostic assay." J Mol Diagn **14**(5): 510-517.

Gillen, A. E., N. Gosalia, S. H. Leir and A. Harris (2011). "MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene." Biochem J **438**(1): 25-32.

Girodon-Boulandet, E. and C. Costa (2005). "Génétique de la mucoviscidose." Médecine thérapeutique/Pédiatrie **8**(3): 126-134.

Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch and R. Shiekhattar (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature **432**(7014): 235-240.

Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman and A. J. Enright (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D140-144.

Guo, L. M., Y. Pu, Z. Han, T. Liu, Y. X. Li, M. Liu, X. Li and H. Tang (2009). "MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF-kappaB1." FEBS J **276**(19): 5537-5546.

Hajj, R., P. Lesimple, B. Nawrocki-Raby, P. Birembaut, E. Puchelle and C. Coraux (2007). "Human airway surface epithelial regeneration is delayed and abnormal in cystic fibrosis." J Pathol **211**(3): 340-350.

Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, J. W. Nam, I. Heo, J. K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B. T. Zhang and V. N. Kim (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." Cell **125**(5): 887-901.

Han, J., J. S. Pedersen, S. C. Kwon, C. D. Belair, Y. K. Kim, K. H. Yeom, W. Y. Yang, D. Haussler, R. Blelloch and V. N. Kim (2009). "Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8." Cell **136**(1): 75-84.

Hartzell, C., I. Putzier and J. Arreola (2005). "Calcium-activated chloride channels." Annu Rev Physiol **67**: 719-758.

Hassan, F., G. J. Nuovo, M. Crawford, P. N. Boyaka, S. Kirkby, S. P. Nana-Sinkam and E. Cormet-Boyaka (2012). "MiR-101 and miR-144 regulate the expression of the CFTR chloride channel in the lung." PLoS One **7**(11): e50837.

Heda, G. D., M. Tanwani and C. R. Marino (2001). "The Delta F508 mutation shortens the biochemical half-life of plasma membrane CFTR in polarized epithelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **280**(1): C166-174.

Henke, J. I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C. G. Schuttler, C. Fehr, C. Junemann and M. Niepmann (2008). "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA." EMBO J **27**(24): 3300-3310.

Huang, F., H. Zhang, M. Wu, H. Yang, M. Kudo, C. J. Peters, P. G. Woodruff, O. D. Solberg, M. L. Donne, X. Huang, D. Sheppard, J. V. Fahy, P. J. Wolters, B. L. Hogan, W. E. Finkbeiner, M. Li, Y. N. Jan, L. Y. Jan and J. R. Rock (2012). "Calcium-activated chloride channel TMEM16A modulates mucin secretion and airway smooth muscle contraction." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(40): 16354-16359.

Huntzinger, E. and E. Izaurralde (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay." Nat Rev Genet **12**(2): 99-110.

Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P. D. Zamore (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.

Ianowski, J. P., J. Y. Choi, J. J. Wine and J. W. Hanrahan (2007). "Mucus secretion by single tracheal submucosal glands from normal and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice." J Physiol **580**(Pt 1): 301-314.

Ibanez-Ventoso, C., M. Vora and M. Driscoll (2008). "Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology." PLoS One **3**(7): e2818.

Jacquot, J., M. Delion, S. Gangloff, J. Braux and F. Velard (2016). "Bone disease in cystic fibrosis: new pathogenic insights opening novel therapies." Osteoporos Int **27**(4): 1401-1412.

Jacquot, J., E. Puchelle, J. Hinnrasky, C. Fuchey, C. Bettinger, C. Spilmont, N. Bonnet, A. Dieterle, D. Dreyer, A. Pavirani and et al. (1993). "Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway secretory glands." Eur Respir J **6**(2): 169-176.

Janssen, H. L., H. W. Reesink, E. J. Lawitz, S. Zeuzem, M. Rodriguez-Torres, K. Patel, A. J. van der Meer, A. K. Patick, A. Chen, Y. Zhou, R. Persson, B. D. King, S. Kauppinen, A. A. Levin and M. R. Hodges (2013). "Treatment of HCV infection by targeting microRNA." N Engl J Med **368**(18): 1685-1694.

Jeffery, P. K. and D. Li (1997). "Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes." Eur Respir J **10**(7): 1655-1662.

Jentsch, T. J., V. Stein, F. Weinreich and A. A. Zdebek (2002). "Molecular structure and physiological function of chloride channels." Physiol Rev **82**(2): 503-568.

Jung, J., J. H. Nam, H. W. Park, U. Oh, J. H. Yoon and M. G. Lee (2013). "Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> permeability by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(1): 360-365.

Kapinas, K. and A. M. Delany (2011). "MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling." Arthritis Res Ther **13**(3): 220.

Keller, A., P. Leidinger, A. Bauer, A. Elsharawy, J. Haas, C. Backes, A. Wendschlag, N. Giese, C. Tjaden, K. Ott, J. Werner, T. Hackert, K. Ruprecht, H. Huwer, J. Huebers, G. Jacobs, P. Rosenstiel, H. Dommisch, A. Schaefer, J. Muller-Quernheim, B. Wullich, B. Keck, N. Graf, J. Reichrath, B. Vogel, A. Nebel, S. U. Jager, P. Staehler, I. Amarantos, V. Boisguerin, C. Staehler, M. Beier, M. Scheffler, M. W. Buchler, J. Wischhusen, S. F. Haeusler, J. Dietl, S. Hofmann, H. P. Lenhof, S. Schreiber, H. A. Katus, W. Rottbauer, B. Meder, J. D. Hoheisel, A. Franke and E. Meese (2011). "Toward the blood-borne miRNome of human diseases." Nat Methods **8**(10): 841-843.

Kellerman, D., R. Evans, D. Mathews and C. Shaffer (2002). "Inhaled P2Y<sub>2</sub> receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease." Adv Drug Deliv Rev **54**(11): 1463-1474.

Kerem, B., J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald and L. C. Tsui (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis." Science **245**(4922): 1073-1080.

Kerem, E., S. Hirawat, S. Armoni, Y. Yaakov, D. Shoseyov, M. Cohen, M. Nissim-Rafinia, H. Blau, J. Rivlin, M. Aviram, G. L. Elfring, V. J. Northcutt, L. L. Miller, B. Kerem and M. Wilschanski (2008). "Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial." Lancet **372**(9640): 719-727.

Kerem, E., M. W. Konstan, K. De Boeck, F. J. Accurso, I. Sermet-Gaudelus, M. Wilschanski, J. S. Elborn, P. Melotti, I. Bronsveld, I. Fajac, A. Malfroot, D. B. Rosenbluth, P. A. Walker, S. A. McColley, C. Knoop, S. Quattrucci, E. Rietschel, P. L. Zeitlin, J. Barth, G. L. Elfring, E. M. Welch, A. Branstrom, R. J. Spiegel, S. W. Peltz, T. Ajayi, S. M. Rowe and G. Cystic Fibrosis Ataluren Study (2014). "Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial." Lancet Respir Med **2**(7): 539-547.

Kertesz, M., N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul and E. Segal (2007). "The role of site accessibility in microRNA target recognition." Nat Genet **39**(10): 1278-1284.

Kidd, J. F. and P. Thorn (2000). "Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> channel activation in secretory cells." Annu Rev Physiol **62**: 493-513.

Kim, S. J. and W. R. Skach (2012). "Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum." Front Pharmacol **3**: 201.

Knight, D. A. and S. T. Holgate (2003). "The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease." Respirology **8**(4): 432-446.

Knowles, M. R., J. L. Carson, A. M. Collier, J. T. Gatzky and R. C. Boucher (1981). "Measurements of nasal transepithelial electric potential differences in normal human subjects in vivo." Am Rev Respir Dis **124**(4): 484-490.

Knowles, M. R., L. L. Clarke and R. C. Boucher (1991). "Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis." N Engl J Med **325**(8): 533-538.

Kogan, I., M. Ramjeesingh, C. Li, J. F. Kidd, Y. Wang, E. M. Leslie, S. P. Cole and C. E. Bear (2003). "CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux." Embo J **22**(9): 1981-1989.

Kotloff, R. M., S. C. FitzSimmons and S. B. Fiel (1992). "Fertility and pregnancy in patients with cystic fibrosis." Clin Chest Med **13**(4): 623-635.

Kreda, S. M., M. Mall, A. Mengos, L. Rochelle, J. Yankaskas, J. R. Riordan and R. C. Boucher (2005). "Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia." Mol Biol Cell **16**(5): 2154-2167.

Kunzelmann, K. (2015). "TMEM16, LRRC8A, bestrophin: chloride channels controlled by Ca(2+) and cell volume." Trends Biochem Sci **40**(9): 535-543.

Kunzelmann, K., P. Kongsuphol, F. Aldehni, Y. Tian, J. Ousingasawat, R. Warth and R. Schreiber (2009). "Bestrophin and TMEM16-Ca(2+) activated Cl(-) channels with different functions." Cell Calcium **46**(4): 233-241.

Kunzelmann, K., M. Mall, M. Briel, A. Hipper, R. Nitschke, S. Ricken and R. Greger (1997). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> conductance of *Xenopus oocytes*." Pflugers Arch **435**(1): 178-181.

Kunzelmann, K., Y. Tian, J. R. Martins, D. Faria, P. Kongsuphol, J. Ousingasawat, L. Wolf and R. Schreiber (2012). "Airway epithelial cells--functional links between CFTR and anoctamin dependent Cl<sup>-</sup> secretion." Int J Biochem Cell Biol **44**(11): 1897-1900.

Kuruma, A. and H. C. Hartzell (2000). "Bimodal control of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel by different Ca(2+) signals." J Gen Physiol **115**(1): 59-80.

Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-858.

Lanford, R. E., E. S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M. E. Munk, S. Kauppinen and H. Orum (2010). "Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection." Science **327**(5962): 198-201.

Le Heron, L., C. Guillaume, F. Velard, J. Braux, L. Touqui, S. Moriceau, I. Sermet-Gaudelus, D. Laurent-Maquin and J. Jacquot (2010). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) regulates the production of osteoprotegerin (OPG) and prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> in human bone." J Cyst Fibros **9**(1): 69-72.

Leblanc, N., J. Ledoux, S. Saleh, A. Sanguinetti, J. Angermann, K. O'Driscoll, F. Britton, B. A. Perrino and I. A. Greenwood (2005). "Regulation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle cells: a complex picture is emerging." Can J Physiol Pharmacol **83**(7): 541-556.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.

Lee, Y., I. Hur, S. Y. Park, Y. K. Kim, M. R. Suh and V. N. Kim (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." EMBO J **25**(3): 522-532.

Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-4060.

Leigh, M. W., J. E. Kylander, J. R. Yankaskas and R. C. Boucher (1995). "Cell proliferation in bronchial epithelium and submucosal glands of cystic fibrosis patients." Am J Respir Cell Mol Biol **12**(6): 605-612.

Lewis, B. P., C. B. Burge and D. P. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

Lindow, M. and S. Kauppinen (2012). "Discovering the first microRNA-targeted drug." J Cell Biol **199**(3): 407-412.

Linsdell, P. and J. W. Hanrahan (1998). "Glutathione permeability of CFTR." Am J Physiol **275**(1 Pt 1): C323-326.

Linsdell, P., J. A. Tabcharani, J. M. Rommens, Y. X. Hou, X. B. Chang, L. C. Tsui, J. R. Riordan and J. W. Hanrahan (1997). "Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions." J Gen Physiol **110**(4): 355-364.

Little, A. A., P. E. McKeever and K. L. Gruis (2013). "Novel mutations in the Anoctamin 5 gene (ANO5) associated with limb-girdle muscular dystrophy 2L." Muscle Nerve **47**(2): 287-291.

Lukacs, G. L., A. Mohamed, N. Kartner, X. B. Chang, J. R. Riordan and S. Grinstein (1994). "Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP." Embo J **13**(24): 6076-6086.

Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg and U. Kutay (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-98.

Mall, M., M. Bleich, R. Greger, R. Schreiber and K. Kunzelmann (1998). "The amiloride-inhibitable Na<sup>+</sup> conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways." J Clin Invest **102**(1): 15-21.

Mall, M., B. R. Grubb, J. R. Harkema, W. K. O'Neal and R. C. Boucher (2004). "Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice." Nat Med **10**(5): 487-493.

Marcet, B., B. Chevalier, G. Luxardi, C. Coraux, L. E. Zaragosi, M. Cibois, K. Robbe-Sermesant, T. Jolly, B. Cardinaud, C. Moreilhon, L. Giovannini-Chami, B. Nawrocki-Raby, P. Birembaut, R. Waldmann, L. Kodjabachian and P. Barbry (2011). "Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway." Nat Cell Biol **13**(6): 693-699.

Marcet, B., B. Chevalier, G. Luxardi, C. Coraux, L. E. Zaragosi, M. Cibois, K. Robbe-Sermesant, T. Jolly, B. Cardinaud, C. Moreilhon, L. Giovannini-Chami, B. Nawrocki-Raby, P. Birembaut, R. Waldmann, L. Kodjabachian and P. Barbry (2011). "Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway." Nat Cell Biol **13**(6): 693-699.

Marcorelles, P., T. Montier, D. Gillet, N. Lagarde and C. Ferec (2007). "Evolution of CFTR protein distribution in lung tissue from normal and CF human fetuses." *Pediatr Pulmonol* **42**(11): 1032-1040.

Matsui, H., B. R. Grubb, R. Tarran, S. H. Randell, J. T. Gatzky, C. W. Davis and R. C. Boucher (1998). "Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease." *Cell* **95**(7): 1005-1015.

Mayer, M. (2016). "Lumacaftor-ivacaftor (Orkambi) for cystic fibrosis: behind the 'breakthrough'." *Evid Based Med* **21**(3): 83-86.

Mazzone, A., C. E. Bernard, P. R. Strege, A. Beyder, L. J. Galiotta, P. J. Pasricha, J. L. Rae, H. P. Parkman, D. R. Linden, J. H. Szurszewski, T. Ordog, S. J. Gibbons and G. Farrugia (2011). "Altered expression of Ano1 variants in human diabetic gastroparesis." *J Biol Chem* **286**(15): 13393-13403.

McKiernan, P. J., O. Cunningham, C. M. Greene and S. A. Cryan (2013). "Targeting miRNA-based medicines to cystic fibrosis airway epithelial cells using nanotechnology." *Int J Nanomedicine* **8**: 3907-3915.

Megiorni, F., S. Cialfi, G. Cimino, R. V. De Biase, C. Dominici, S. Quattrucci and A. Pizzuti (2013). "Elevated levels of miR-145 correlate with SMAD3 down-regulation in Cystic Fibrosis patients." *J Cyst Fibros*.

Megiorni, F., S. Cialfi, G. Cimino, R. V. De Biase, C. Dominici, S. Quattrucci and A. Pizzuti (2013). "Elevated levels of miR-145 correlate with SMAD3 down-regulation in Cystic Fibrosis patients." *J Cyst Fibros* **12**(6): 797-802.

Megiorni, F., S. Cialfi, C. Dominici, S. Quattrucci and A. Pizzuti (2011). "Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding." *PLoS One* **6**(10): e26601.

Miledi, R. (1982). "A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **215**(1201): 491-497.

Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30): 10513-10518.

Mithal, A. and J. L. Emery (1976). "Squamous metaplasia of the tracheal epithelium in children." *Thorax* **31**(2): 167-171.

Mogayzel, P. J., Jr., E. T. Naureckas, K. A. Robinson, G. Mueller, D. Hadjiladis, J. B. Hoag, L. Lubsch, L. Hazle, K. Sadosky, B. Marshall and C. Pulmonary Clinical Practice Guidelines (2013). "Cystic fibrosis pulmonary guidelines. Chronic medications for maintenance of lung health." Am J Respir Crit Care Med **187**(7): 680-689.

Morales, M. M., T. P. Carroll, T. Morita, E. M. Schwiebert, O. Devuyst, P. D. Wilson, A. G. Lopes, B. A. Stanton, H. C. Dietz, G. R. Cutting and W. B. Guggino (1996). "Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney." Am J Physiol **270**(6 Pt 2): F1038-1048.

Moran, R. (1988). Visual Histology. Philadelphia.

Moss, R. B. (2013). "Pitfalls of drug development: lessons learned from trials of denufosol in cystic fibrosis." J Pediatr **162**(4): 676-680.

Mukherji, S., M. S. Ebert, G. X. Zheng, J. S. Tsang, P. A. Sharp and A. van Oudenaarden (2011). "MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression." Nat Genet **43**(9): 854-859.

Munck, A. and M. Roussey (2008). "[The French nationwide cystic fibrosis newborn screening program: strategy and results]." Arch Pediatr **15 Suppl 1**: S1-6.

Namkung, W., Z. Yao, W. E. Finkbeiner and A. S. Verkman (2011). "Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction." FASEB J **25**(11): 4048-4062.

Nilius, B. and G. Droogmans (2003). "Amazing chloride channels: an overview." Acta Physiol Scand **177**(2): 119-147.

Nilius, B., J. Prenen, T. Voets, K. Van den Bremt, J. Eggermont and G. Droogmans (1997). "Kinetic and pharmacological properties of the calcium-activated chloride-current in macrovascular endothelial cells." Cell Calcium **22**(1): 53-63.

O'Connor, G. T., H. B. Quinton, R. Kahn, P. Robichaud, J. Maddock, T. Lever, M. Detzer, J. G. Brooks and C. Northern New England Cystic Fibrosis (2002). "Case-mix adjustment for evaluation of mortality in cystic fibrosis." Pediatr Pulmonol **33**(2): 99-105.

O'Driscoll, K. E., R. A. Pipe and F. C. Britton (2011). "Increased complexity of Tmem16a/Anoctamin 1 transcript alternative splicing." BMC Mol Biol **12**: 35.

O'Sullivan, B. P. and S. D. Freedman (2009). "Cystic fibrosis." Lancet **373**(9678): 1891-1904.

Oglesby, I. K., R. Agrawal, M. A. Mall, N. G. McElvaney and C. M. Greene (2015). "miRNA-221 is elevated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates expression of ATF6." Mol Cell Pediatr **2**(1): 1.

Oglesby, I. K., I. M. Bray, S. H. Chotirmall, R. L. Stallings, S. J. O'Neill, N. G. McElvaney and C. M. Greene (2010). "miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression." J Immunol **184**(4): 1702-1709.

Oglesby, I. K., S. H. Chotirmall, N. G. McElvaney and C. M. Greene (2013). "Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by microRNA-145, -223, and -494 is altered in DeltaF508 cystic fibrosis airway epithelium." J Immunol **190**(7): 3354-3362.

Oglesby, I. K., S. F. Vencken, R. Agrawal, K. Gaughan, K. Molloy, G. Higgins, P. McNally, N. G. McElvaney, M. A. Mall and C. M. Greene (2015). "miR-17 overexpression in cystic fibrosis airway epithelial cells decreases interleukin-8 production." Eur Respir J **46**(5): 1350-1360.

Ooi, C. Y. and P. R. Durie (2016). "Cystic fibrosis from the gastroenterologist's perspective." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **13**(3): 175-185.

Ottosen, S., T. B. Parsley, L. Yang, K. Zeh, L. J. van Doorn, E. van der Veer, A. K. Raney, M. R. Hodges and A. K. Patick (2015). "In vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsin, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122." Antimicrob Agents Chemother **59**(1): 599-608.

Ousingsawat, J., P. Kongsuphol, R. Schreiber and K. Kunzelmann (2011). "CFTR and TMEM16A are separate but functionally related Cl<sup>-</sup> channels." Cell Physiol Biochem **28**(4): 715-724.

Ousingsawat, J., J. R. Martins, R. Schreiber, J. R. Rock, B. D. Harfe and K. Kunzelmann (2009). "Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca<sup>2+</sup>-dependent chloride transport." J Biol Chem **284**(42): 28698-28703.

Ozsolak, F., L. L. Poling, Z. Wang, H. Liu, X. S. Liu, R. G. Roeder, X. Zhang, J. S. Song and D. E. Fisher (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." Genes Dev **22**(22): 3172-3183.

Paccou, J., N. Zeboulon, C. Combescure, L. Gossec and B. Cortet (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): 1-7.

Papassotiriou, J., J. Eggermont, G. Droogmans and B. Nilius (2001). "Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels in Ehrlich ascites tumor cells are distinct from mCLCA1, 2 and 3." Pflugers Arch **442**(2): 273-279.

Paradiso, A. M., C. M. Ribeiro and R. C. Boucher (2001). "Polarized signaling via purinoceptors in normal and cystic fibrosis airway epithelia." J Gen Physiol **117**(1): 53-67.

Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P.

Leahy, E. Davidson and G. Ruvkun (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-89.

Pedemonte, N. and L. J. Galletta (2014). "Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins)." Physiol Rev **94**(2): 419-459.

Penttila, S., J. Palmio, T. Suominen, O. Raheem, A. Evila, N. Muelas Gomez, G. Tasca, L. B. Waddell, N. F. Clarke, A. Barboi, P. Hackman and B. Udd (2012). "Eight new mutations and the expanding phenotype variability in muscular dystrophy caused by ANO5." Neurology **78**(12): 897-903.

Peterson, S. M., J. A. Thompson, M. L. Ufkin, P. Sathyanarayana, L. Liaw and C. B. Congdon (2014). "Common features of microRNA target prediction tools." Front Genet **5**: 23.

Petrukhin, K., M. J. Koisti, B. Bakall, W. Li, G. Xie, T. Marknell, O. Sandgren, K. Forsman, G. Holmgren, S. Andreasson, M. Vujic, A. A. Bergen, V. McGarty-Dugan, D. Figueroa, C. P. Austin, M. L. Metzker, C. T. Caskey and C. Wadelius (1998). "Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy." Nat Genet **19**(3): 241-247.

Pifferi, S., M. Dibattista, C. Sagheddu, A. Boccaccio, A. Al Qteishat, F. Ghirardi, R. Tirindelli and A. Menini (2009). "Calcium-activated chloride currents in olfactory sensory neurons from mice lacking bestrophin-2." J Physiol **587**(Pt 17): 4265-4279.

Pranke, I. M. and I. Sermet-Gaudelus (2014). "Biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Int J Biochem Cell Biol **52**: 26-38.

Qu, Z. and H. C. Hartzell (2000). "Anion permeation in Ca(2+)-activated Cl(-) channels." J Gen Physiol **116**(6): 825-844.

Qu, Z., R. W. Wei, W. Mann and H. C. Hartzell (2003). "Two bestrophins cloned from *Xenopus laevis* oocytes express Ca(2+)-activated Cl(-) currents." J Biol Chem **278**(49): 49563-49572.

Qu, Z., W. Yao, R. Yao, X. Liu, K. Yu and C. Hartzell (2014). "The Ca(2+) -activated Cl(-) channel, ANO1 (TMEM16A), is a double-edged sword in cell proliferation and tumorigenesis." Cancer Med **3**(3): 453-461.

Ramachandran, S., P. H. Karp, P. Jiang, L. S. Ostedgaard, A. E. Walz, J. T. Fisher, S. Keshavjee, K. A. Lennox, A. M. Jacobi, S. D. Rose, M. A. Behlke, M. J. Welsh, Y. Xing and P. B. McCray, Jr. (2012). "A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(33): 13362-13367.

Ramachandran, S., P. H. Karp, S. R. Osterhaus, P. Jiang, C. Wohlford-Lenane, K. A. Lennox, A. M. Jacobi, K. Praekh, S. D. Rose, M. A. Behlke, Y. Xing, M. J. Welsh and P. B. McCray, Jr. (2013). "Post-

transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs." Am J Respir Cell Mol Biol **49**(4): 544-551.

Ratjen, F., T. Durham, T. Navratil, A. Schaberg, F. J. Accurso, C. Wainwright, M. Barnes, R. B. Moss and T.-S. I. Group (2012). "Long term effects of denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis." J Cyst Fibros **11**(6): 539-549.

Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou and et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**(4922): 1066-1073.

Rock, J. R., C. R. Futtner and B. D. Harfe (2008). "The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea." Dev Biol **321**(1): 141-149.

Rock, J. R., W. K. O'Neal, S. E. Gabriel, S. H. Randell, B. D. Harfe, R. C. Boucher and B. R. Grubb (2009). "Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca<sup>2+</sup>-regulated Cl<sup>-</sup> secretory channel in mouse airways." J Biol Chem **284**(22): 14875-14880.

Rommens, J. M., M. C. Iannuzzi, B. Kerem, M. L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J. L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka and et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping." Science **245**(4922): 1059-1065.

Ross, P. (2006). Histology. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.

Ruffin, M., M. Volland, S. Marie, M. Bonora, E. Blanchard, S. Blouquit-Laye, E. Naline, P. Puyo, P. Le Rouzic, L. Guillot, H. Corvol, A. Clement and O. Tabary (2013). "Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis." Biochim Biophys Acta **1832**(12): 2340-2351.

Russo, F., S. Di Bella, G. Nigita, V. Macca, A. Lagana, R. Giugno, A. Pulvirenti and A. Ferro (2012). "miRandola: extracellular circulating microRNAs database." PLoS One **7**(10): e47786.

Saini, H. K., A. J. Enright and S. Griffiths-Jones (2008). "Annotation of mammalian primary microRNAs." BMC Genomics **9**: 564.

Sands, D. (2013). "Transepithelial nasal potential difference (NPD) measurements in cystic fibrosis (CF)." Med Wieku Rozwoj **17**(1): 13-17.

Schreiber, R., R. Nitschke, R. Greger and K. Kunzelmann (1999). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells." J Biol Chem **274**(17): 11811-11816.

Schreiber, R., H. Pavenstadt, R. Greger and K. Kunzelmann (2000). "Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." FEBS Lett **475**(3): 291-295.

Schreiber, R., I. Uliyakina, P. Kongsuphol, R. Warth, M. Mirza, J. R. Martins and K. Kunzelmann (2010). "Expression and function of epithelial anoctamins." J Biol Chem **285**(10): 7838-7845.

Schroeder, B. C., T. Cheng, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2008). "Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit." Cell **134**(6): 1019-1029.

Schuster, A., C. Haliburn, G. Doring, M. H. Goldman and G. Freedom Study (2013). "Safety, efficacy and convenience of colistimethate sodium dry powder for inhalation (Colobreathe DPI) in patients with cystic fibrosis: a randomised study." Thorax **68**(4): 344-350.

Scudieri, P., E. Caci, S. Bruno, L. Ferrera, M. Schiavon, E. Sondo, V. Tomati, A. Gianotti, O. Zegarra-Moran, N. Pedemonte, F. Rea, R. Ravazzolo and L. J. Galletta (2012). "Association of TMEM16A chloride channel overexpression with airway goblet cell metaplasia." J Physiol **590**(23): 6141-6155.

Seidler, U., I. Blumenstein, A. Kretz, D. Viellard-Baron, H. Rossmann, W. H. Colledge, M. Evans, R. Ratcliff and M. Gregor (1997). "A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca(2+)-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion." J Physiol **505 ( Pt 2)**: 411-423.

Sermet-Gaudelus, I., K. D. Boeck, G. J. Casimir, F. Vermeulen, T. Leal, A. Mogenet, D. Roussel, J. Fritsch, L. Hanssens, S. Hirawat, N. L. Miller, S. Constantine, A. Reha, T. Ajayi, G. L. Elfring and L. L. Miller (2010). "Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **182**(10): 1262-1272.

Sermet-Gaudelus, I., A. Munck, M. Rota, M. Roussey, D. Feldmann, T. Nguyen-Khoa and m. Groupe de travail "Depistage neonatal" de la Federation des centres de ressources et de competences de la (2010). "[French guidelines for sweat test practice and interpretation for cystic fibrosis neonatal screening]." Arch Pediatr **17**(9): 1349-1358.

Sheppard, D. N. and M. J. Welsh (1999). "Structure and function of the CFTR chloride channel." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S23-45.

Sheridan, J. T., E. N. Worthington, K. Yu, S. E. Gabriel, H. C. Hartzell and R. Tarran (2011). "Characterization of the oligomeric structure of the Ca(2+)-activated Cl<sup>-</sup> channel Ano1/TMEM16A." J Biol Chem **286**(2): 1381-1388.

Singh, G. and S. L. Katyal (1997). "Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10)." Am J Respir Cell Mol Biol **17**(2): 141-143.

Sleigh, M. A., J. R. Blake and N. Liron (1988). "The propulsion of mucus by cilia." Am Rev Respir Dis **137**(3): 726-741.

Sondo, E., E. Caci and L. J. Galletta (2014). "The TMEM16A chloride channel as an alternative therapeutic target in cystic fibrosis." Int J Biochem Cell Biol **52**: 73-76.

Sondo, E., P. Scudieri, V. Tomati, E. Caci, A. Mazzone, G. Farrugia, R. Ravazzolo and L. J. Galletta (2014). "Non-canonical translation start sites in the TMEM16A chloride channel." Biochim Biophys Acta **1838**(1 Pt B): 89-97.

Sonneville, F., M. Ruffin, L. Guillot, N. Rousselet, P. Le Rouzic, H. Corvol and O. Tabary (2015). "New insights about miRNAs in cystic fibrosis." Am J Pathol **185**(4): 897-908.

Southern, K. W., P. M. Barker, A. Solis-Moya and L. Patel (2012). "Macrolide antibiotics for cystic fibrosis." Cochrane Database Syst Rev **11**: CD002203.

Spielberg, D. R. and J. P. Clancy (2016). "Cystic Fibrosis and Its Management Through Established and Emerging Therapies." Annu Rev Genomics Hum Genet.

Stephan, A. B., E. Y. Shum, S. Hirsh, K. D. Cygnar, J. Reisert and H. Zhao (2009). "ANO2 is the cilia calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(28): 11776-11781.

Stohr, H., J. B. Heisig, P. M. Benz, S. Schoberl, V. M. Milenkovic, O. Strauss, W. M. Aartsen, J. Wijnholds, B. H. Weber and H. L. Schulz (2009). "TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals." J Neurosci **29**(21): 6809-6818.

Sun, H., T. Tsunenari, K. W. Yau and J. Nathans (2002). "The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 4008-4013.

Suzuki, J., M. Umeda, P. J. Sims and S. Nagata (2010). "Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F." Nature **468**(7325): 834-838.

Tabary, O., J. M. Zahm, J. Hinrasky, J. P. Couetil, P. Cornillet, M. Guenounou, D. Gaillard, E. Puchelle and J. Jacquot (1998). "Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro." Am J Pathol **153**(3): 921-930.

Takamizawa, J., H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi and T. Takahashi (2004). "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival." Cancer Res **64**(11): 3753-3756.

Takeshita, F., L. Patrawala, M. Osaki, R. U. Takahashi, Y. Yamamoto, N. Kosaka, M. Kawamata, K. Kelnar, A. G. Bader, D. Brown and T. Ochiya (2010). "Systemic delivery of synthetic microRNA-16

inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes." Mol Ther **18**(1): 181-187.

Terashima, H., A. Picollo and A. Accardi (2013). "Purified TMEM16A is sufficient to form Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(48): 19354-19359.

Tian, Y., P. Kongsuphol, M. Hug, J. Ousingawat, R. Witzgall, R. Schreiber and K. Kunzelmann (2011). "Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A." FASEB J **25**(3): 1058-1068.

Tian, Y., R. Schreiber and K. Kunzelmann (2012). "Anoctamins are a family of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels." J Cell Sci **125**(Pt 21): 4991-4998.

Tian, Y., R. Schreiber, P. Wanitchakool, P. Kongsuphol, M. Sousa, I. Uliyakina, M. Palma, D. Faria, A. E. Traynor-Kaplan, J. I. Fragata, M. D. Amaral and K. Kunzelmann (2013). "Control of TMEM16A by INO-4995 and other inositolphosphates." Br J Pharmacol **168**(1): 253-265.

Tien, J., H. Y. Lee, D. L. Minor, Jr., Y. N. Jan and L. Y. Jan (2013). "Identification of a dimerization domain in the TMEM16A calcium-activated chloride channel (CaCC)." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(16): 6352-6357.

Tildy, B. E. and D. F. Rogers (2015). "Therapeutic options for hydrating airway mucus in cystic fibrosis." Pharmacology **95**(3-4): 117-132.

Totary-Jain, H., D. Sanoudou, I. Z. Ben-Dov, C. N. Dautriche, P. Guarnieri, S. O. Marx, T. Tuschl and A. R. Marks (2013). "Reprogramming of the microRNA transcriptome mediates resistance to rapamycin." J Biol Chem **288**(9): 6034-6044.

Trang, P., P. P. Medina, J. F. Wiggins, L. Ruffino, K. Kelnar, M. Omotola, R. Homer, D. Brown, A. G. Bader, J. B. Weidhaas and F. J. Slack (2010). "Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA." Oncogene **29**(11): 1580-1587.

van der Ree, M. H., A. J. van der Meer, J. de Bruijne, R. Maan, A. van Vliet, T. M. Welzel, S. Zeuzem, E. J. Lawitz, M. Rodriguez-Torres, V. Kupcova, A. Wiercinska-Drapalo, M. R. Hodges, H. L. Janssen and H. W. Reesink (2014). "Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients." Antiviral Res **111**: 53-59.

van der Ree, M. H., A. J. van der Meer, A. C. van Nuenen, J. de Bruijne, S. Ottosen, H. L. Janssen, N. A. Kootstra and H. W. Reesink (2016). "Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma." Aliment Pharmacol Ther **43**(1): 102-113.

Van Goor, F., S. Hadida, P. D. Grootenhuis, B. Burton, D. Cao, T. Neuberger, A. Turnbull, A. Singh, J. Joubran, A. Hazlewood, J. Zhou, J. McCartney, V. Arumugam, C. Decker, J. Yang, C. Young, E. R. Olson, J. J. Wine, R. A. Frizzell, M. Ashlock and P. Negulescu (2009). "Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(44): 18825-18830.

Van Goor, F., S. Hadida, P. D. Grootenhuis, B. Burton, J. H. Stack, K. S. Straley, C. J. Decker, M. Miller, J. McCartney, E. R. Olson, J. J. Wine, R. A. Frizzell, M. Ashlock and P. A. Negulescu (2011). "Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(46): 18843-18848.

Vanscoy, L. L., S. M. Blackman, J. M. Collaco, A. Bowers, T. Lai, K. Naughton, M. Algire, R. McWilliams, S. Beck, J. Hoover-Fong, A. Hamosh, D. Cutler and G. R. Cutting (2007). "Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **175**(10): 1036-1043.

Vasudevan, S. and J. A. Steitz (2007). "AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2." Cell **128**(6): 1105-1118.

Veit, G., F. Bossard, J. Goepf, A. S. Verkman, L. J. Galletta, J. W. Hanrahan and G. L. Lukacs (2012). "Proinflammatory cytokine secretion is suppressed by TMEM16A or CFTR channel activity in human cystic fibrosis bronchial epithelia." Mol Biol Cell **23**(21): 4188-4202.

Vermeer, S., A. Hoischen, R. P. Meijer, C. Gilissen, K. Neveling, N. Wieskamp, A. de Brouwer, M. Koenig, M. Anheim, M. Assoum, N. Drouot, S. Todorovic, V. Milic-Rasic, H. Lochmuller, G. Stevanin, C. Goizet, A. David, A. Durr, A. Brice, B. Kremer, B. P. van de Warrenburg, M. M. Schijvenaars, A. Heister, M. Kwint, P. Arts, J. van der Wijst, J. Veltman, E. J. Kamsteeg, H. Scheffer and N. Knoers (2010). "Targeted next-generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals ANO10 mutations in patients with autosomal-recessive cerebellar ataxia." Am J Hum Genet **87**(6): 813-819.

Viard, V., A. Bergougnoux, J. Bonini, J. Varilh, R. Chiron, O. Tabary, N. Molinari, M. Claustres and M. Taulan-Cadars (2015). "Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis." Eur Respir J **45**(1): 116-128.

Vocke, K., K. Dauner, A. Hahn, A. Ulbrich, J. Broecker, S. Keller, S. Frings and F. Mohrlen (2013). "Calmodulin-dependent activation and inactivation of anoctamin calcium-gated chloride channels." J Gen Physiol **142**(4): 381-404.

Voynow, J. A., B. M. Fischer, B. C. Roberts and A. D. Proia (2005). "Basal-like cells constitute the proliferating cell population in cystic fibrosis airways." Am J Respir Crit Care Med **172**(8): 1013-1018.

Wainwright, C. E., J. S. Elborn and B. W. Ramsey (2015). "Lumacaftor-ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR." N Engl J Med **373**(18): 1783-1784.

Ward, C. L. and R. R. Kopito (1994). "Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins." J Biol Chem **269**(41): 25710-25718.

Weber, J. A., D. H. Baxter, S. Zhang, D. Y. Huang, K. H. Huang, M. J. Lee, D. J. Galas and K. Wang (2010). "The microRNA spectrum in 12 body fluids." Clin Chem **56**(11): 1733-1741.

Weichselbaum, M., M. P. Sparrow, E. J. Hamilton, P. J. Thompson and D. A. Knight (2005). "A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium." Respir Res **6**: 115.

Weldon, S., P. McNally, D. F. McAuley, I. K. Oglesby, C. L. Wohlford-Lenane, J. A. Bartlett, C. J. Scott, N. G. McElvaney, C. M. Greene, P. B. McCray, Jr. and C. C. Taggart (2014). "miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production." Am J Respir Crit Care Med **190**(2): 165-174.

Welsh, M. J. and A. E. Smith (1995). "Cystic fibrosis." Sci Am **273**(6): 52-59.

Wiggins, J. F., L. Ruffino, K. Kelnar, M. Omotola, L. Patrawala, D. Brown and A. G. Bader (2010). "Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34." Cancer Res **70**(14): 5923-5930.

Wightman, B., I. Ha and G. Ruvkun (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell **75**(5): 855-862.

Wilschanski, M. and P. R. Durie (2007). "Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene." Gut **56**(8): 1153-1163.

Wilschanski, M., Y. Yahav, Y. Yaacov, H. Blau, L. Bentur, J. Rivlin, M. Aviram, T. Bdolah-Abram, Z. Bebok, L. Shushi, B. Kerem and E. Kerem (2003). "Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations." N Engl J Med **349**(15): 1433-1441.

Winkelmann, A. and T. Noack (2010). "The Clara cell: a "Third Reich eponym"?" Eur Respir J **36**(4): 722-727.

Wong, P. Y. (1998). "CFTR gene and male fertility." Mol Hum Reprod **4**(2): 107-110.

Xiao, Q., K. Yu, P. Perez-Cornejo, Y. Cui, J. Arreola and H. C. Hartzell (2011). "Voltage- and calcium-dependent gating of TMEM16A/Ano1 chloride channels are physically coupled by the first intracellular loop." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(21): 8891-8896.

Yang, W., T. P. Chendrimada, Q. Wang, M. Higuchi, P. H. Seeburg, R. Shiekhattar and K. Nishikura (2006). "Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases." Nat Struct Mol Biol **13**(1): 13-21.

Yang, Y. D., H. Cho, J. Y. Koo, M. H. Tak, Y. Cho, W. S. Shim, S. P. Park, J. Lee, B. Lee, B. M. Kim, R. Raouf, Y. K. Shin and U. Oh (2008). "TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance." Nature **455**(7217): 1210-1215.

Yu, K., C. Duran, Z. Qu, Y. Y. Cui and H. C. Hartzell (2012). "Explaining calcium-dependent gating of anoctamin-1 chloride channels requires a revised topology." Circ Res **110**(7): 990-999.

Yu, K., Q. Xiao, G. Cui, A. Lee and H. C. Hartzell (2008). "The best disease-linked Cl<sup>-</sup> channel hBest1 regulates Ca<sup>v</sup>1 (L-type) Ca<sup>2+</sup> channels via src-homology-binding domains." J Neurosci **28**(22): 5660-5670.

Zhang, P. X., J. Cheng, S. Zou, A. D. D'Souza, J. L. Koff, J. Lu, P. J. Lee, D. S. Krause, M. E. Egan and E. M. Bruscia (2015). "Pharmacological modulation of the AKT/microRNA-199a-5p/CAV1 pathway ameliorates cystic fibrosis lung hyper-inflammation." Nat Commun **6**: 6221.

Zhong, T., J. M. Perelman, V. P. Kolosov and X. D. Zhou (2011). "MiR-146a negatively regulates neutrophil elastase-induced MUC5AC secretion from 16HBE human bronchial epithelial cells." Mol Cell Biochem **358**(1-2): 249-255.

# **Annexes**



## REVIEW

# New Insights about miRNAs in Cystic Fibrosis



Florence Sonnevile,<sup>\*†</sup> Manon Ruffin,<sup>\*†</sup> Loïc Guillot,<sup>\*†</sup> Nathalie Rousselet,<sup>\*†</sup> Philippe Le Rouzic,<sup>\*†</sup> Harriet Corvol,<sup>\*†‡</sup> and Olivier Tabary<sup>\*†</sup>

From Inserm UMR\_S938,\* CDR Saint-Antoine, Paris; the Sorbonne Universités,<sup>†</sup> UPMC University Paris 06, Paris; and the Paediatric Respiratory Department,<sup>‡</sup> Hôpital Trousseau, AP-HP, Paris, France

Accepted for publication  
December 1, 2014.

Address correspondence to  
Olivier Tabary, Ph.D., Inserm  
UMR\_S938, CDR Saint-  
Antoine, Bât. Kourilsky 2ème  
Étage, 34 Rue Crozatier, 75012  
Paris, France. E-mail: [olivier.tabary@inserm.fr](mailto:olivier.tabary@inserm.fr).

The molecular basis of cystic fibrosis (CF) is a mutation-related defect in the epithelial–cell chloride channel called CF transmembrane conductance regulator (CFTR). This defect alters chloride ion transport and impairs water transport across the cell membrane. Marked clinical heterogeneity occurs even among patients carrying the same mutation in the *CFTR* gene. Recent studies suggest that such heterogeneity could be related to epigenetic factors and/or miRNAs, which are small noncoding RNAs that modulate the expression of various proteins via post-transcriptional inhibition of gene expression. In the respiratory system, it has been shown that the dysregulation of miRNAs could participate in and lead to pathogenicity in several diseases. In CF airways, recent studies have proposed that miRNAs may modulate disease progression by affecting the production of either CFTR or various proteins that are dysregulated in the CF lung. Herein, we provide an overview of studies showing how miRNAs may modulate CF pathology and the efforts to develop miRNA-based treatments and/or to consider miRNAs as biomarkers. The identification of miRNAs involved in CF disease progression opens up new avenues toward treatments targeting selected clinical components of CF, independently from the *CFTR* mutation. (*Am J Pathol* 2015, 185: 897–908; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.022>)

The most common lethal genetic disorder in whites is cystic fibrosis (CF). It is caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. More than 1900 pathogenic variants of this gene have been identified. The most common mutation (70%) is an in-frame phenylalanine 508 deletion (F508del-*CFTR*) that induces severe lung disease attributed to impaired trafficking of the mutated CFTR protein to the plasma membrane (Figure 1). The CFTR protein is an apical chloride (Cl<sup>-</sup>) channel that not only participates directly in fluid homeostasis at the epithelium surface, but also regulates other Cl<sup>-</sup> channels, non-Cl<sup>-</sup> channels such as the epithelial Na<sup>+</sup> channel, and the transport of molecules, such as glutathione.<sup>1–3</sup> Extensive studies on the *CFTR* gene and its protein have been conducted since its discovery and characterization in 1989.<sup>4</sup> Nevertheless, the complex mechanisms which regulate *CFTR* expression remain poorly understood, and the sequence of CFTR-channel activation is empirical and unclear. Surprisingly, new treatments designed to correct the mutated CFTR protein defect have clearly focused the attention of some laboratories on defective CFTR

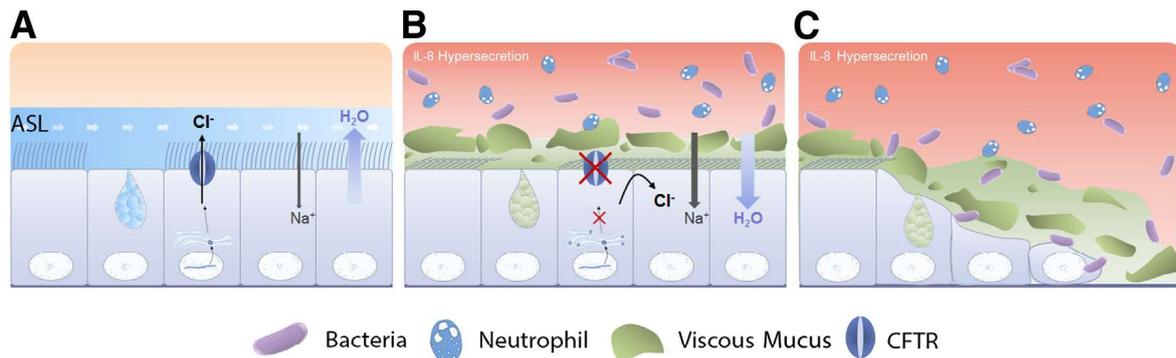
processing and have greatly improved our knowledge of the CFTR channel.<sup>5,6</sup>

## Physiopathology

In the CF pathology, morbidity and mortality are mainly related to self-perpetuating cycles of airway obstruction, infection, and inflammation.<sup>7</sup> There is a pressing need for research into the sequence of events leading to progressive lung tissue damage, which remains incompletely understood. Initially, CFTR deficiency induces the loss of Cl<sup>-</sup> secretion and the loss of epithelial Na<sup>+</sup> channel inhibition that leads to excess sodium and water reabsorption, resulting in dehydration of airway surface liquid compared to physiological situation (Figure 1, A and B).<sup>8</sup> This imbalance

Supported by Inserm, UPMC-Paris 06 University, nonprofit organization Vaincre la Mucoviscidose, Legs Poix-Chancellerie des Universités-Paris, a Vaincre la Mucoviscidose Ph.D. grant (F.S.), and an Émergence-UPMC 2010 research program Ph.D. grant (M.R.).

Disclosures: None declared.



**Figure 1** Diagram comparing the non-cystic fibrosis (non-CF; **A**) and CF (**B** and **C**) pulmonary epithelium. **A:** The CF transmembrane conductance regulator (CFTR) defect causes hydromineral imbalance characterized by a decrease in the output of chloride ions (Cl<sup>-</sup>), an increase in the entry of sodium ions (Na<sup>+</sup>), and a dehydration of the airway surface liquid (ASL) leading to a viscous mucus. **B:** The alteration of mucociliary clearance induced by viscous mucus promotes cycles of airway obstruction, infection by various pathogens, and inflammation characterized by neutrophil accumulation and IL-8 overproduction. **C:** IL-8 is consensually described as the marker of pulmonary inflammation in CF lungs; excessive neutrophil degranulation with inflammation damages the pulmonary epithelium.

results in the depletion of the airway surface liquid and in the increase of mucus viscosity that induces an impaired mucociliary clearance. In addition, infection and inflammation are observed and become persistent. Clinical data obtained during the past decade suggest that inflammation may precede infection, but this point is still debated.<sup>9,10</sup> The F508del-*CFTR* mutation causes a massive proinflammatory phenotype in the lungs, characterized by an overexpression of chemoattractant molecules, such as IL-8, a proinflammatory cytokine whose expression is significantly increased in the CF airway and known as a marker of the pulmonary inflammation in CF. IL-8 is a well-known chemoattractant for neutrophil in the lung epithelium, participates in lung defense<sup>7,9-12</sup> (Figure 1, B and C), and is a reference to evaluate CF airway inflammation. Many studies have demonstrated a crucial role for the transcription factor (TF) NF- $\kappa$ B in the lung inflammation but have failed to identify a clear link between CFTR and NF- $\kappa$ B, despite some evidence implicating ionic homeostasis.<sup>7,13-16</sup> Elucidating the mechanisms that underlie the inflammatory response might result in therapeutic improvements, thereby improving both the quality of life and length of survival of CF patients. In parallel, the lungs of children become chronically infected. Typically, infants are colonized by *Haemophilus influenzae* and/or *Staphylococcus aureus* but quickly *Pseudomonas aeruginosa* becomes the predominant organism in the airways.<sup>17</sup> This chronic infection perpetuates a vicious circle of infection and inflammation, leading to destruction and remodeling of the airway epithelium (Figure 1C), bronchiectasis, hypoxemia, hypercarbia, and, finally, pulmonary insufficiency. Despite remarkable advances in the knowledge achieved after the identification of the disease-causing gene, the clinical outcome for CF patients remains dependent on the gradual decline in lung function. Unfortunately, the mechanisms underlying the lung disease progression remain unclear, and the impact of polymorphisms throughout the genome complicates the outcome prediction. To date, minimal correlations have

been found between *CFTR* genotype and disease severity, suggesting a role for environmental, stochastic, and genetic factors in the clinical heterogeneity of patients carrying the same mutation.<sup>18,19</sup>

## Treatments of CF Lung Disease

CF lung treatment strategies target multiple steps in the progression of the pathology, including rehydration of the airway surface, mucolytics, anti-inflammatory agents, anti-infective agents, and, more recently, CFTR protein modulation.<sup>13</sup>

### Current Treatments

Until now, CF has no cure, even if treatments have greatly improved life expectancy in past decades.<sup>13</sup> The current lung disease treatments are symptomatic and proposed to treat CF lung pathology, fundamentally managing the consequences induced by the CFTR failure. One of the main treatments is the chest physical therapy, aiming at loosening and expectorating the excessive and hyperviscous airway mucus. To increase the mucus clearance, pharmacological treatments are also used, such as inhaled recombinant human DNase.<sup>14</sup> The prevention and treatment of bacterial lung infections is deemed as a primary aim in CF. Improved antibiotic treatment strategies against airway infections are regarded as the main reason for the increased life expectancy of the CF patients in the past decade.<sup>20</sup> Many CF centers try to eradicate airway bacteria colonization with several antibiotics, even in the absence of symptoms. Oral antibiotics are often used to treat mild lung infections. By contrast, inhaled antibiotics may be used to prevent or control infections due to the mucoid *P. aeruginosa*. For severe or hard-to-treat infections, patients may be given i.v. antibiotics.

As outlined above, inflammation is a hallmark of CF lung pathology,<sup>7</sup> and can be treated with drugs that have pleiotropic effects on cytokine secretion and/or neutrophils. Therefore, early trials of anti-inflammatory treatment have been done with

corticosteroids, but serious adverse effects, such as glucose intolerance, bone demineralization, and growth delay, were observed.<sup>21</sup> To improve the risk/benefit ratio, inhaled steroids could be prescribed, but benefits have not been shown clearly.<sup>22</sup> Long-term macrolide antibiotic therapies are also prescribed to decrease CF lung inflammation.<sup>23</sup> After evidence of a tremendous efficacy in diffuse panbronchiolitis, a disease that shares similarities with CF lung disease, they have been proposed in CF with great successes. The mechanism of efficacy of macrolides may be related to their antimicrobial, and anti-inflammatory, properties, and specifically in CF, to an activation of the chloride efflux.<sup>24,25</sup> Among the several macrolides, azithromycin is the most used, with fewer adverse effects than other macrolides and dosing intervals. Other anti-inflammatory therapies proposed in CF are often confidential to a group or to a specific country.<sup>26</sup>

All these approaches are symptomatic, and do not directly target CFTR protein activity and/or the defective gene. In this context, new therapies that target the mutated CFTR protein to cure CF are under development.

### New Approaches to Correct CFTR

Among the many evaluated strategies designed to correct CF abnormalities, only a few drugs targeting the mutated CFTR protein have shown meaningful efficiency to provide hope to the patients. These new drugs are small molecules that correct the trafficking and/or activity of the mutated CFTR. As introduced, several *CFTR* mutations lead to different mutated proteins. The most effective drug designed is a potentiator that targets CFTR gating mutations, by improving the channel opening probability, namely ivacaftor (VX-770; Vertex Pharmaceuticals Incorporated, Cambridge, MA). Although promising, ivacaftor is effective only in a few CF patients worldwide, because it has limited efficacy in patients carrying the F508del mutation.<sup>5,26–28</sup> Preliminary results from two phase 3 trial studies using a combination of ivacaftor and a CFTR corrector (lumacaftor; VX-809; Vertex Pharmaceuticals Incorporated) have recently shown significant improvements in the lung function of patients homozygous for the *CFTR* F508del mutation, despite absence of proof-of-concept data.<sup>26</sup> Some groups have also demonstrated that this strategy, combining potentiator and corrector, could be limited, and new strategies still need to be proposed. In fact, potentiators make CFTR less stable at the apical membrane.<sup>29,30</sup> In this context, further research is needed to produce an array of strategies appropriate for all *CFTR* mutations. Thus, several groups have suggested that miRNA-targeted therapies might generate benefits by increasing CFTR chloride efflux.<sup>31–33</sup> Further studies need to be conducted to produce new strategies appropriate for the various stages of CF disease.

### miRNA Data

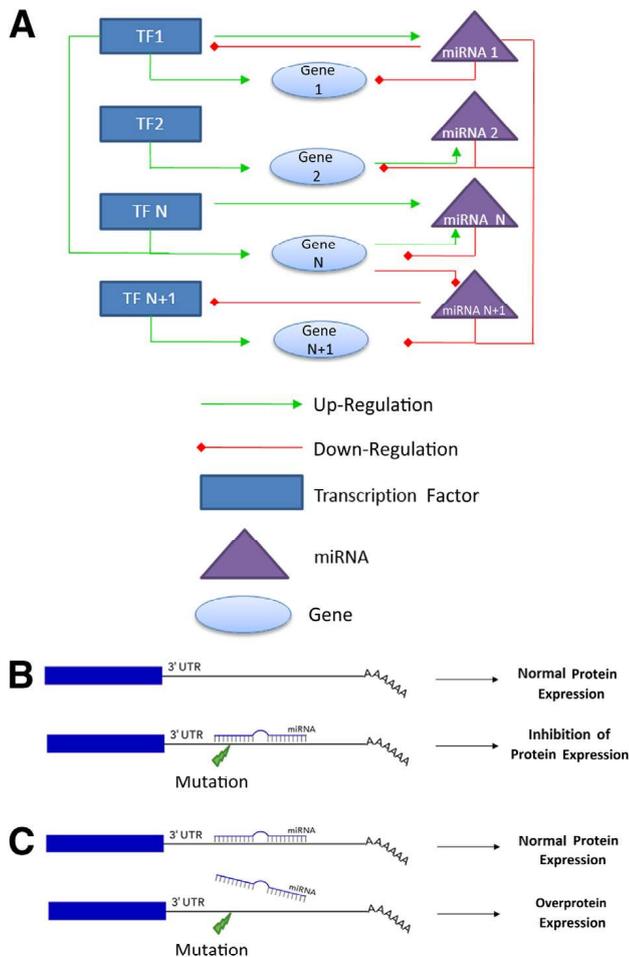
miRNAs are small (20 to 24 nucleotides) noncoding RNAs that regulate post-transcriptional gene expression. Since the

identification of the first miRNA, *lin-4*, in the nematode *Caenorhabditis elegans*, >1800 miRNAs have been found in humans<sup>34,35</sup> and listed in the database miRbase 21 (<http://www.mirbase.org>, last accessed June 1, 2014). The miRNA biogenesis is well described.<sup>36–38</sup> The miRNAs constitute a large family of phylogenetically conserved genes expressed in all cell types and tissues. The crucial role for miRNAs in protein regulation was recognized only recently. The full miRNA system may regulate >60% of protein-coding genes in human cells, and miRNA dysregulation is involved in many lung diseases, including CF.<sup>39–42</sup>

### Mechanisms of Action of miRNAs

In numerous cases, miRNAs may provide a pleiotropic mechanism to explain the apparent complexity of different pathologies. Via a canonical pathway, miRNAs predominantly down-regulate the expression of their target genes by pairing with the 3'-untranslated regions (UTRs) of target mRNAs, thereby inducing mRNA degradation or translation inhibition.<sup>43</sup> Thus, miRNA down-regulation results in increased protein expression of the targeted genes, whereas miRNA up-regulation represses their expression. This system of regulation, associated with TFs, allows a fine control of protein expression. The different possibilities and the complexity of these regulations are illustrated in Figure 2A. A TF can control the expression of different genes and/or miRNAs. The product of one gene can also control the expression of multiple miRNAs. However, one miRNA can influence the expression of different TFs and/or genes (Figure 2A). Recently, it has been proposed that miRNAs could directly bind DNA and, in the case of synonymous variants, alter a binding for miRNA and thereby modify the expression of the target gene<sup>44</sup> (Figure 2, B and C). Modifications, such as mutations or polymorphisms, may change miRNA attachment and consequently inhibit expression of the protein of interest (Figure 2, B and C). Conversely, change in the 3'-UTR of an mRNA sequence can inhibit the binding of a miRNA and induce protein overexpression. In physiopathology, few variations could completely change the protein profile expression and therefore alter normal physiology.

Although the mechanisms underlying the effects of miRNAs are now well understood, the origin of miRNA dysregulation in disease is generally unknown. The mechanisms that control miRNA processing in specific cells and tissues need to be elucidated. The function and expression of mature miRNAs are controlled by mechanisms that regulate the processing of pri-miRNAs and pre-miRNAs.<sup>31</sup> The complexity of the regulation system is important to recognize because each miRNA can target multiple mRNAs (Figure 2A). Each miRNA belongs to a multifactorial system of pathways subjected to many regulation systems. This extraordinary complexity substantially complicates efforts to understand the miRNA system and to offer simple



**Figure 2** **A:** Diagram of interaction between miRNAs, genes, and transcriptional factor (TF) to regulate gene/protein expression. A miRNA regulates one or more genes, which are regulated by TFs that can also regulate the expression of other miRNAs. **B and C:** Mutation/polymorphism in the noncodant 3'-untranslated region (UTR) of a gene may modify the affinity of a miRNA for the 3'-UTR of the gene and, thus, alter the protein expression.

therapy. Because miRNAs are involved in the regulation of protein-coding gene expression, they play a role in many processes that induce disease states, such as cancer, and participate in CF pathology.<sup>45,46</sup>

### miRNA Target Prediction Tools

Since the discovery of miRNAs in 1993, the view on gene expression regulation has started to change. Studies have been focused on predicting the target genes. This method is empirical and needs to be confirmed by biological experiments, whereas miRNome studies become easier. Two approaches have been used to study RNA regulation by miRNAs to determine the eventual link between miRNAs and RNAs.

First, the gene candidate approach is based on *in silico* analysis with bioinformatic databases predicting a score of miRNAs that could bind to RNAs of interest. It is important to use several bases because the results obtained are

variable, depending on the criteria. Nowadays, different algorithms have been developed by different laboratories to predict miRNA-mRNA interaction, such as DIANA-microT, TargetScan, miRWalk, miRanda, and PicTar. These algorithms are based not only on base pairing between miRNAs and the mRNA 3'-UTR, thermodynamic stability of miRNA-mRNA duplex, conservation of target sites, and free energy, but also on cooperative translational control and multiplicity of miRNA binding sites.<sup>47,48</sup> The main algorithms used by the resources are artificial neural network, hidden Markov model, Naïve bayes, restricted bayesian, or support vector machine and could be combined to optimize the prediction. For example, TargetScan, one of the famous resources for miRNA-RNA interaction, used a restricted bayesian network model considering target position, conservation between species, and A-U-rich flanking regional accessibility. These different algorithms are used to avoid the many false-positive results obtained with the complementary sequence method.

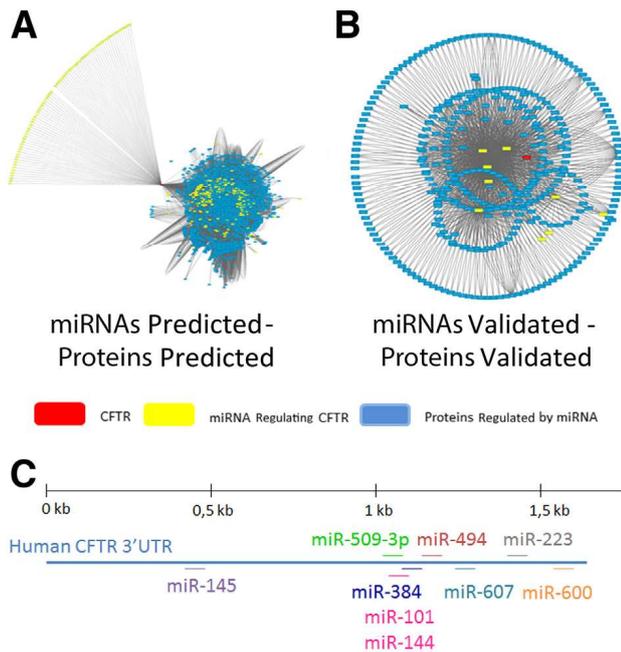
The common practice for researchers is to look at predictions from several miRNA-target interaction algorithms and focus on their intersection; then, predictive results require validation by biological models. To illustrate this, we have predicted, using MirWalk software,<sup>49</sup> without specific criteria, miRNAs that could bind CFTR and proteins that could bind these miRNAs (Figure 3A). miRNA targets were predicted by combinatorial use of five different web-based databases (miRanda, miRDB, miRwalk, RNA22, and TargetScan). The results were presented with Cytoscape software version 3.1.1.<sup>50</sup> More than 49,000 proteins—half of all proteins expressed on human cells—are predicted to be regulated by miRNAs regulating CFTR. This example illustrates the importance of experimental *in vitro* and *in vivo* validation. Figure 3B shows the validated miRNAs regulating CFTR and represents only validated proteins regulated by these miRNAs. In this validated model, only 1132 proteins are presented. This example illustrates that predictions are just a tool before *in vitro/in vivo* validation.

Second, a data-driven prognostic method without a priori knowledge consisted of studying the differential expression of several miRNAs in CF and non-CF models. This comparison could be performed by different methods of miRNA expression profiling as microarray, miRNA sequencing, PCR arrays, and Fluidigm. *In silico* studies were then performed to determine whether the miRNAs overexpressed in CF were predicted to target *CFTR*.

As such, these two approaches are complementary and respond to different needs. Both methods have been used to find miRNAs implicated in the pathophysiology of CF.

### miRNAs and Genetic Diseases

Considering that miRNAs can regulate the expression of numerous target genes, miRNAs are expected to regulate various physiological processes, including apoptosis,



**Figure 3** **A** and **B**: Network of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR; red) regulation mediated by miRNAs (yellow) that could influence the expression of other proteins. **A**: miRNAs predicted by *in silico* analysis to target CFTR (red) and other predicted proteins (blue). **B**: miRNAs demonstrated by *in vivo* experiments to regulate CFTR and known to regulate other proteins. **C**: miRNA target sequence location within the 3'-untranslated region (UTR) of the CFTR mRNA.

inflammation, differentiation, and proliferation. It is expected that mutations affecting miRNA function could have a pathogenic role in human genetic disease, similar to protein-coding genes. For example, numerous articles have shown that aberrant miRNA expression is implicated in numerous human cancers, but without a direct link between miRNAs and human genetic diseases.<sup>45,51,52</sup> To date, there are no examples of mutations that are clearly associated with human mendelian disease because the regulation of miRNAs is redundant and a significant alteration of the function may elicit a minor perturbation of biological processes. Meola et al<sup>53</sup> have well summarized and described three main types of mutation mechanisms affecting miRNA function: i) mutations affecting miRNAs directly, ii) mutations in the 3'-UTR of target mRNA, and iii) mutations in genes that participate in the process of miRNA function. In the first case, only two kinds of mutations affecting miRNAs have been described, mutations with a large sequence of genes affecting miRNAs<sup>53</sup> or polymorphism in the seed sequence miRNA.<sup>54</sup> In the case of mutation in the 3'-UTR, the first report identified two different sequences in the binding site of miR-189 in the 3'-UTR of the SLITRK1 mRNA in Tourette syndrome.<sup>55</sup> Now, many articles have reported this kind of mutation affecting the regulation of mRNAs. In the last case of mutation, only few human mutations were described to participate in miRNA maturation. For example, one of this mutation affects DGGR8, a component of Drosha complex implicated in the maturation of miRNAs, which

participates in DiGeorge syndrome.<sup>56</sup> A complete loss of function of the core protein components of the miRNA processing is incompatible with life.

Altogether, the role of miRNAs in genetic diseases needs to be investigated more, especially in CF pathology.

## miRNAs and the Pathophysiology of CF

Although many studies have focused on the role for miRNAs in regulating *CFTR* gene expression, little attention had been directed to other aspects, such as airway obstruction, inflammation, and infection.

### Regulation of *CFTR* by miRNAs

Several groups are investigating the role for miRNAs in molecular pathways involved in the pathogenesis of CF. In particular, the regulation of expression by miRNAs of *CFTR* wild-type and mutated genes has been examined. Furthermore, the mRNA of *CFTR* is low abundant in airway epithelia, and miRNAs may silence low-abundance mRNA targets more efficiently than high-abundance mRNAs.<sup>32,57</sup>

By using *in silico* analyses, Gillen et al<sup>58</sup> identified miRNAs that directly repressed *CFTR* expression by binding to the 3'-UTR segment of the transcript. *CFTR* regulation seems to differ across the three cell lines used (Table 1). Interestingly, some miRNAs that repressed *CFTR* expression also targeted the  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter NKCC1 channel, suggesting a general role for miRNAs in coordinating chloride transport and cell volume across epithelial cell membranes. miR-101 and miR-494 markedly repress *CFTR* expression in human embryonic kidney 293 cells when used alone, and the effect is considerably increased when the two miRNAs are combined.<sup>61</sup> *In silico* analysis established that miR-101 and miR-494 can target other genes known to influence the disease severity of CF patients. A coordinated network of gene expression controlled by miRNAs has been suggested.<sup>61</sup> In addition, air pollutants decrease the expression of *CFTR* and increase the expression of miR-101 and miR-144 in 16HBE14o- bronchial epithelial cells. Interestingly, miR-101 is up-regulated in the lung of patients with chronic obstructive pulmonary disease, a condition characterized by low levels of *CFTR* expression.<sup>63</sup>

This approach with RNA-miRNA is limited by prediction tools, and next-generation sequencing allows the analysis of different situations (eg, CF versus non-CF) without preconceived ideas. Two groups studied global miRNA expression in CF and non-CF models before performing *in silico* analyses. Interestingly, miR-138 has been predicted to target the TF SIN3A, which is able to bind the *CTCF*-binding sites of *CFTR*.<sup>62</sup> SIN3A is a target of miR-138 in airway epithelia, which regulates *CFTR* expression by suppressing SIN3A. Furthermore, miR-138 overexpression increases the expression and number of *CFTR* molecules reaching the cell surface, as well as

**Table 1** Deregulated Demonstrated miRNAs in Cystic Fibrosis and Their Targets

Year	miRNA	Direct target	Indirect target	Cell types	Reference
2010	miR-126	TOM1		Bronchial brushings, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	42
2011	miR-155 miR-494, miR-384, miR-376b, miR-1246, miR-145, miR-331-3p, and miR-939	SHIP1 CFTR	IL-8	IB3-1, S9 Caco-2	59
2011	miR-600, miR-494, miR-384, miR-1290, miR-1246, miR-145, miR-1827, miR-331-3p, and miR-939	CFTR		PANC-1	58
2011	miR-600, miR-494, miR-607, and miR-384 miR-101, miR-1246, miR-494, and miR-384 miR-449	CFTR SLC12A2 Notch1		16HBE14o- PANC-1 Primary air-liquid interface cultures of human airway epithelia	60
2011	miR-101 and miR-494	CFTR		HEK293	61
2012	miR-138	SIN3A	CFTR	Primary air-liquid interface cultures of human airway epithelia; Calu3, HEK293, HeLa	62
2012	miR-101 and miR-144	CFTR		16HBE14o-	63
2013	miR-145, miR-223, and miR-494	CFTR		Bronchial brushings, 16HBE14o-, CFBE41o-, HEK293	64
2013	miR-145	SMAD3		Nasal epithelium of patients with HEK293	65
2013	miR-509-3p and miR-494	CFTR		Primary air-liquid interface cultures of human airway epithelia; Calu3	32

CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; SHIP, Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 protein; TOM, translocase of the outer membrane.

CFTR activity in cells expressing not only wild-type CFTR, but also CFTR-F508del, thus opening therapeutic avenues for restoring CFTR function.<sup>62</sup>

A direct link between miRNAs and *CFTR* expression in CF has been reported.<sup>64</sup> *CFTR* is directly regulated by miR-145, miR-223, and miR-494 when used alone, with a synergistic effect of combinations of these miRNAs. Furthermore, deficient CFTR channel activity is a possible cause of the overexpression of miR-145, miR-223, and miR-494 in CF.<sup>64</sup> Recently, miR-509-3p and miR-494 have been identified as post-transcriptional CFTR repressors that act synergistically to produce larger effects in CF. There is a reported link between the expression of the two miRNAs and CFTR function.<sup>32</sup>

However, the system of *CFTR* regulation by miRNAs seems more complex, with numerous parameters not yet elucidated. The regulation of *CFTR* changes before and after birth; the *CFTR* gene undergoes tissue-specific and temporal changes in expression.<sup>66</sup> This regulation is tightly controlled by TFs and miRNAs. To increase complexity, gene mutation in miRNA targeting sites of CFTR could be a new pathogenetic mechanism in CF.<sup>67</sup> Three single-nucleotide polymorphisms, one of which is located in a region predicted to bind miR-433 and miR-509 and causes a small decrease in CFTR protein expression due to enhanced binding of miR-509-3p, have been identified (Figure 2, B and C). Further studies need to be performed to understand the effects of miRNA on the *CFTR* gene. The discussed studies illustrate the complex mechanisms by

which miRNAs convey functional binding to CFTR mRNA targets. We have summarized in Figure 3C demonstrated binding sites of miRNAs regulating CFTR in pulmonary cells. Extensive analysis needs to be conducted before proposing miRNAs as therapeutic targets.

### miRNAs, Inflammation, and CF

Chronic airway inflammation is a major component of CF pathophysiology. The genesis of this inflammation remains unclear but could involve miRNAs. Different approaches have been used to assess the role for miRNAs in CF inflammation.

A global approach to identify miRNAs that were dysregulated in CF provided the first set of evidence.<sup>42</sup> miR-126 was found to be down-regulated in CF compared to the non-CF models *in vivo* and *in vitro*. Results showed that miR-126 targets the IL-1R1 and Toll-like receptor 2 and 4 signaling inhibitor translocase of the outer membrane 1 and the NF- $\kappa$ B pathway.

An expression screen of a miRNA library in F508del-CFTR and wild-type CFTR lung epithelial cell lines identified miRNAs associated with the proinflammatory phenotype in the CF lung.<sup>59</sup> miR-155 is up-regulated in CF cells, both *in vitro* and *in vivo*, and there is a link between CFTR activity and miR-155 expression. By using bioinformatics analysis and *in vitro* cell-line experiments, a direct link between the levels of miR-155 and those of Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1

protein was established. This relationship indirectly affects IL-8 protein expression via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway activation and downstream mitogen-activated protein kinase signaling activation. miR-155 overexpression in CF is mediated by the RNA-binding proteins tristetraprolin and KH-type splicing regulatory protein, known to regulate miRNA processing.<sup>31</sup> In studies evaluating inflammation, IL-8, and the TF NF- $\kappa$ B in CF, a binding site for NF- $\kappa$ B at the 5'-UTR segment of two CFTR-regulating miRNAs was identified. CFTR expression and function decrease to a larger extent when NF- $\kappa$ B is functional.<sup>32</sup> Thus, inflammatory processes under NF- $\kappa$ B control influence miRNA expression, through an unknown mechanism, thereby regulating CFTR expression and function. Another proinflammatory profile in CF is linked to dysregulation of the transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling pathway via SMAD3 proteins. By using a candidate miRNA approach, miR-145 was found to regulate SMAD3 expression in human embryonic kidney 293 cells. miR-145 and SMAD3 mRNA levels negatively correlate in nasal respiratory epithelial cells from CF patients.<sup>65</sup> SMAD3 is a protein that protects against infections and inflammation. These studies documenting a link between miRNAs and CF inflammation suggest new ways of developing treatment strategies to decrease inflammation in CF patients.

### Regulation of CF Lung Obstruction and Infection by miRNAs

Loss of homeostasis of airway surface liquid volume in patients with CF may impair mucus structure, clearance, and airway defenses. In the airway epithelium, CFTR abnormalities cause dehydration of the mucus, which becomes thick and viscous, impairing mucociliary clearance and affecting respiratory function. Thus, elucidating airway mucus regulation is a current research objective. The MUC5AC mucin is a major airway mucus component whose production is stimulated by neutrophil elastase. miR-146a decreases the production of MUC5AC.<sup>68</sup> Thus, miR-146a may be involved in controlling mucus secretion by human bronchial epithelial cells. The role for MUC5AC expression is highly controversial, although some evidences point to an effect on the severity of CF lung disease.<sup>69</sup> A better understanding of this protein regulation in physiological context could be essential to adapt the treatment of CF patients.

To investigate the hypothesis that miRNAs are important regulators of multiciliogenesis in vertebrates, Marcet et al<sup>60</sup> studied the miRNA expression profile before and after multiciliogenesis in both primary cultures of differentiated human airway mucociliary epithelial cells grown at an air-liquid interface, and in the mucociliary epidermis of *Xenopus* embryos. Interestingly, the same miRNA, miR-449, is up-regulated during multiciliogenesis in both models and promotes multiciliogenesis by directly repressing the Delta/Notch pathway known to be

associated with cell proliferation and differentiation. The thick viscous mucus in CF airways encourages local colonization by various pathogens, such as *H. influenza*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*. Only a few groups are working on links between miRNAs and the innate immune response, which is the first line of defense against infections by exogenous pathogens. In CF, the expression of miRNAs targeting CFTR increases<sup>32,64</sup>; the presence of pathogens in the CF airway epithelium modulates the expression of miRNAs, which, in turn, regulates CFTR. The expression of miR-93 and IL-8 is correlated during *P. aeruginosa* infection in bronchial epithelial cells, and a combined treatment based on the use of different pre-miRNAs has been proposed to achieve high efficiency.<sup>70</sup>

In Table 1, we have summarized the different deregulated miRNAs that have been shown to regulate CFTR and other proteins in the context of CF. Altogether, these data indicate new mechanisms that may influence the expression of CFTR and the development of CF pathology. This first step of research has led to new therapeutics, to specifically target CFTR protein.

## Perspectives

### miRNAs as Biomarkers

A major clinical problem in CF is the absence of a specific biomarker for monitoring and/or predicting lung disease progression. Spirometry measurements constitute the reference standard to date. The forced vital capacity and forced expiratory volume in 1 second, although widely used to assess disease progression, are affected by multiple lung changes, such as inflammation, infection, and respiratory epithelium damage. The most relevant techniques for assessing inflammation and cell functions are invasive and cannot be used in regular clinical practices. In this context, epigenetics, and particularly miRNAs, as one of the important epigenetic mechanisms that regulate gene expression, should constitute a promising field for the development of biomarkers in the comprehension of CF.

For several diseases, identifying biomarkers and improving the diagnosis are key challenges for researchers and clinicians. Various miRNAs have emerged as crucial post-transcriptional gene expression regulators involved in many normal and pathological processes. Several characteristics of miRNAs suggest their usefulness as biomarkers, despite the uncertain role of these circulating miRNAs in biological functions.

miRNAs are extremely resistant to degradation, so miRNAs are ideal candidates as biomarkers for cancer diagnostics. Thus, different groups have found that miRNAs are highly stable in serum or plasma, despite the presence of high levels of ribonuclease activity in blood. For example, incubation of plasma at room temperature for up to 24 hours led to no decrease in the level of circulating miRNAs; more miRNAs present in serum are insensible to modification of pH.<sup>71,72</sup>

The measurement of miRNAs in body fluid has high potential for future noninvasive diagnostic tests and can be detectable in easily accessible body fluid like peripheral blood. Interestingly, miRNAs are also present in other body fluids, such as the sputum, saliva, and urine.<sup>73</sup> miRNAs are stably present in sputum, and lung adenocarcinoma patients can be differentiated from healthy individuals by using a panel of four sputum miRNAs.<sup>74</sup> Furthermore, differences in the serum miRNA expression pattern correctly separate healthy individuals and patients with various diseases, including lung cancer.<sup>45,75–77</sup>

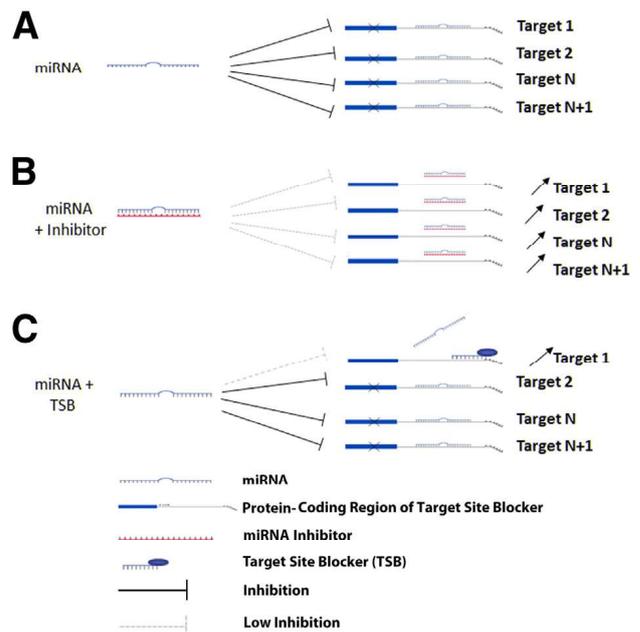
In human peripheral blood, miRNAs are detectable not only in serum or plasma, but also in the cellular fraction. Consequently, miRNA expression can be assessed using simple and affordable molecular biology tools available to laboratories, such as quantitative PCR, and it could be easy to observe the evolution of the pathology at different stages of the illness.

These arguments have led many groups, especially in the field of cancer, to evaluate miRNAs as diagnostic or prognostic biomarkers.<sup>78</sup> These studies are numerous and may be partially applied to the CF domain. The use of miRNAs as minimally invasive biomarkers has generated new opportunities for the diagnosis and prognosis of cancer because they exhibit tumor-specific expression in blood of patients with cancer. The first miRNA aberrantly expressed in lung cancer was identified in 2004.<sup>79</sup> A low level of let-7 expression is significantly associated with poor survival in patients with surgically resected non-small cell lung cancer, suggesting a prognostic role for miRNA assays. A recent multicenter study established that different types of malignant or nonmalignant diseases could be differentiated on the basis of blood-borne miRNA profiles.<sup>80</sup> The miRNA expression levels may also serve as indicators of drug responses in lung cancer.<sup>81</sup> The miRNA pathways involved in several molecular processes will probably be elucidated in the near future to avoid conflicting studies in terms of the miRNAs associated with patient survival.

Despite promising data, no studies have clearly demonstrated the importance of miRNAs as biomarkers in CF. A decrease in the cost of RNA profiling and increased availability of RNA and miRNA profiling should allow the development of standardized protocols. These new insights and the increasing knowledge about the role for miRNAs will help to develop novel miRNA-based therapeutic approaches.

### miRNAs as Therapeutics

It is well accepted that aberrant miRNA expression can occur in various diseases, including lung cancer. Modulators of miRNA expression may, therefore, produce benefits in lung diseases.<sup>82</sup> There are two main obstacles to this treatment approach. To avoid or minimize adverse effects, one or a few relevant targets must be identified, and therefore the pathophysiology of CF must be fully elucidated. The most appropriate cells must be effectively targeted.



**Figure 4** **A:** One miRNA binds to the 3'-untranslated region (UTR) of many mRNAs, and consequently may inhibit mRNA translation or mRNA degradation of these targets. **B:** Specific miRNA inhibition may result in an increased expression of all of the targets. **C:** Specific inhibition of the target site of one miRNA by a modified oligonucleotide may further prevent inhibition of other miRNA targets.

Initial research focused on nucleic acid–based treatments with antisense molecules, including ribozyme, aptamer, and siRNAs. Most of the approaches used to target mRNA sequences rely on RNase H-mediated mRNA degradation on binding to a complementary DNA oligonucleotide.<sup>83</sup> In CF, considerable hope was placed for many years in gene therapy to deliver copies of the wild-type *CFTR* DNA coding sequence to target cells. Since the 1990s, however, research into gene therapy has failed to provide clear evidence of clinical benefits, and no gene therapies have been approved by regulatory authorities. The main problems have been limited efficacy of the gene transfer vector, short-lived gene expression, and adverse effects with both viral and nonviral techniques.<sup>84</sup>

miRNAs are more promising methods of gene correction than other molecules, for many reasons. They are smaller, less antigenic, and easier to insert into cells, compared to their protein-coding counterparts. Although DNA-based approaches require delivery to the nucleus, miRNAs only need to be delivered to the cytoplasm, and the inhibition results in subsequent miRNA degradation and, thus, the up-regulation of target that can be maintained for >3 weeks.<sup>34,75</sup> Another advantage of miRNAs is the limited need for high-strand complementarity.

Modulation of miRNAs is now more currently used in basic science to elucidate the mechanisms underlying mRNA function. To date, *in vivo* therapeutic studies have used only single miRNAs, but combinations of miRNAs will be evaluated in the future. Different studies and patents proposed, with the recent development of advanced nebulizers, airway nebulization of miRNAs to more specifically target airway epithelial cells, but the result is highly carrier dependent and

new technologies are needed to increase the yield.<sup>33</sup> In CF, the ideal target is *CFTR* and corrective effects should occur for all *CFTR* mutation variants, without inducing adverse effects.<sup>85</sup>

Interestingly, low levels of gene transfer of *CFTR* to airway epithelia are sufficient to correct chloride transport *in vitro* and *in vivo*.<sup>86–89</sup> Recently, a group cultured 10% of wild-type or corrected cells mixed with 90% of CF cells. The authors demonstrated that the 10% of normal cells were sufficient to normalize the main dysregulated parameters, such as  $\text{Cl}^-$  or  $\text{Na}^+$  conductance and IL-8 secretion.<sup>90</sup> In a concept of gene therapy, this ability to correct the CF parameters by correcting few cells is important, because it is well known that it will be impossible to correct all of the cells of the lungs of CF patients. Furthermore, targeting other  $\text{Cl}^-$  channels, such as the calcium-activated chloride channel called ANO1, may hold promise to compensate for the loss of *CFTR*  $\text{Cl}^-$  activity and the abnormal repair process.<sup>91</sup> However, all other dysregulated proteins in CF could also constitute targets to correct imbalances in physiological parameters. Typically, miRNAs regulate gene expression of multiple targets (Figure 4A). Inhibition of the miRNAs will result in derepression of all these targets and increase the possibility of adverse effects in the use of miRNAs as therapeutic targets (Figure 4B). An interesting approach in therapeutics is to use interfering miRNA-target interactions, which are antisense oligonucleotides that bind to the miRNA target site of an mRNA, thereby preventing miRNAs from gaining access to that site (Figure 4C).

A single miRNA-based treatment is currently used in clinical practice and targets the specific liver-expressed miR-122 using the locked nucleic acid–modified antisense oligonucleotide. After a study on chimpanzees showing that locked nucleic acid–modified anti-miRNAs are specific, nontoxic, and stable, miravirsin has been used for treatment of hepatitis C virus infection and shows prolonged dose-dependent reductions in hepatitis C virus RNA levels in patients with chronic hepatitis C virus infection.<sup>92</sup> Other miRNA-based treatments are being developed.

In CF, it would be interesting to block the target site(s) of miRNA(s) in the 3'-UTR of *CFTR* to avoid miRNA inhibition. Respiratory involvement being predominant, it might be possible to give the miRNA target site blockers to patients by inhalation to avoid adverse effects in other organs. Understanding the mechanism of miRNA function is crucial to identify the best approach for drug design. There is much interest in identifying the role of miRNAs in the modulation of drug responses, but limited studies have been reported. Studies on miRNAs and pharmacogenomics also hold promise for improving the treatment of CF patients.

## Conclusion

The latest research shows that miRNAs exert crucial effects on gene regulation and may play a prominent role in cell

physiology. Improved understanding of the sequence of events has already allowed the use of miRNAs for diagnostic and prognostic purposes and, more specifically, for detecting susceptibility to certain cancers. Currently, the clinical use of miRNAs remains limited, but major changes can be expected in the near future. New tools can specifically target sequences of interest and resolve problems associated with the multiplicity of targets. The main hurdle is identification of miRNAs that target proteins or pathways of interest. In CF, *CFTR* mRNA is a promising target, because the first studies have shown that miRNAs can modulate the normal or mutated *CFTR* protein. In contrast, current treatments target only specific *CFTR* mutations. Although many studies have established the usefulness of miRNAs in targeting *CFTR*, further research is needed to identify the miRNA combination that best corrects the abnormalities without inducing adverse effects. Similarly, the best concentrations and dosing schedules need to be determined. Promising data from preclinical studies indicate that miRNA treatments will be evaluated in patients with CF.

Thus, miRNA therapy is a fascinating and dynamic field of research in CF. The future can be expected to establish a major role for miRNAs as therapeutic agents or diagnostic tools for CF patients.

## References

- Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, Fulmer SB, Allen SS, Cutting GR, Guggino WB: *CFTR* regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 1995, 81:1063–1073
- Rubenstein RC, Lockwood SR, Lide E, Bauer R, Suaud L, Grumbach Y: Regulation of endogenous ENaC functional expression by *CFTR* and  $\Delta F508$ -*CFTR* in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011, 300:L88–L101
- Linsdell P, Hanrahan JW: Glutathione permeability of *CFTR*. *Am J Physiol* 1998, 275:C323–C326
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [Erratum appeared in *Science* 1989, 245:1437]. *Science* 1989, 245: 1066–1073
- Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA: Correction of the F508del-*CFTR* protein processing defect *in vitro* by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:18843–18848
- Ren HY, Grove DE, De La Rosa O, Houck SA, Sopha P, Van Goor F, Hoffman BJ, Cyr DM: VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Mol Biol Cell* 2013, 24: 3016–3024
- Jacquot J, Tabary O, Clement A: Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? *Expert Rev Mol Diagn* 2008, 8: 359–363
- Boucher RC: Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *J Intern Med* 2007, 261:5–16
- Tabary O, Zahm JM, Hinrasky J, Couetil JP, Cornillet P, Guenounou M, Gaillard D, Puchelle E, Jacquot J: Selective up-regulation of chemokine

- IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 1998, 153:921–930
10. Tirouvanziam R, Khazaal I, Peault B: Primary inflammation in human cystic fibrosis small airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, 283:L445–L451
  11. Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jacquot J: Genistein inhibits constitutive and inducible NFkappaB activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am J Pathol* 1999, 155:473–481
  12. Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jacquot J: High susceptibility for cystic fibrosis human airway gland cells to produce IL-8 through the I kappa B kinase alpha pathway in response to extracellular NaCl content. *J Immunol* 2000, 164:3377–3384
  13. Davies JC, Ebdon AM, Orchard C: Recent advances in the management of cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2014, 99:1033–1036
  14. Rowe SM, Clancy JP: Advances in cystic fibrosis therapies. *Curr Opin Pediatr* 2006, 18:604–613
  15. Tabary O, Muselet C, Miesch MC, Yvin JC, Clement A, Jacquot J: Reduction of chemokine IL-8 and RANTES expression in human bronchial epithelial cells by a sea-water derived saline through inhibited nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 309:310–316
  16. Tabary O, Muselet C, Yvin JC, Halley-Vanhove B, Puchelle E, Jacquot J: Physiomer reduces the chemokine interleukin-8 production by activated human respiratory epithelial cells. *Eur Respir J* 2001, 18:661–666
  17. O'Sullivan BP, Freedman SD: Cystic fibrosis. *Lancet* 2009, 373:1891–1904
  18. Cutting GR: Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1214:57–69
  19. Corvol H, Beucher J, Boelle PY, Busson PF, Muselet-Charlier C, Clement A, Ratjen F, Grasmann H, Laki J, Palmer CN, Elborn JS, Mehta A: Ancestral haplotype 8.1 and lung disease severity in European cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2012, 11:63–67
  20. Sherrard LJ, Tunney MM, Elborn JS: Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *Lancet* 2014, 384:703–713
  21. Eigen H, Rosenstein BJ, FitzSimmons S, Schidlow DV: Cystic Fibrosis Foundation Prednisone Trial Group: A multicenter study of alternate-day prednisone therapy in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1995, 126:515–523
  22. Balfour-Lynn IM: Cystic fibrosis papers of the year 2009. *J R Soc Med* 2009, 103(Suppl 1):S6–S14
  23. Yousef AA, Jaffe A: The role of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2010, 11:108–114
  24. Saint-Criq V, Rebeyrol C, Ruffin M, Roque T, Guillot L, Jacquot J, Clement A, Tabary O: Restoration of chloride efflux by azithromycin in airway epithelial cells of cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55:1792–1793
  25. Balloy V, Deveaux A, Lebeaux D, Tabary O, le Rouzic P, Ghigo JM, Busson PF, Boëlle P, Guez JG, Hahn U, Clement A, Chignard M, Corvol H, Burnet M, Guillot L: Azithromycin analogue CSY0073 attenuates lung inflammation induced by LPS challenge. *Br J Pharmacol* 2014, 171:1783–1794
  26. Hoffman LR, Ramsey BW: Cystic fibrosis therapeutics: the road ahead. *Chest* 2013, 143:207–213
  27. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, Turnbull A, Singh A, Joubran J, Hazlewood A, Zhou J, McCartney J, Arumugam V, Decker C, Yang J, Young C, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu P: Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:18825–18830
  28. Yu H, Burton B, Huang CJ, Worley J, Cao D, Johnson JP Jr, Urrutia A, Joubran J, Seepersaud S, Sussky K, Hoffman BJ, Van Goor F: Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J Cyst Fibros* 2012, 11:237–245
  29. Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, Esther CR Jr, Das J, Dokholyan NV, Randell SH, Boucher RC, Gentsch M: Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of DeltaF508 CFTR in cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 2014, 6:246ra96
  30. Veit G, Avramescu RG, Perdomo D, Phuan PW, Bagdany M, Apaja PM, Borot F, Szollosi D, Wu YS, Finkbeiner WE, Hegedus T, Verkman AS, Lukacs GL: Some gating potentiators, including VX-770, diminish DeltaF508-CFTR functional expression. *Sci Transl Med* 2014, 6:246ra97
  31. Bhattacharyya S, Kumar P, Tsuchiya M, Bhattacharyya A, Biswas R: Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP. *Biochem Biophys Res Commun* 2013, 433:484–488
  32. Ramachandran S, Karp PH, Osterhaus SR, Jiang P, Wohlford-Lenane C, Lennox KA, Jacobi AM, Praekx K, Rose SD, Behlke MA, Xing Y, Welsh MJ, McCray PB Jr: Post-transcriptional regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and function by microRNAs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013, 49:544–551
  33. McKiernan P, Cunningham O, Greene C, Cryan S: Targeting miRNA-based medicines to cystic fibrosis airway epithelial cells using nanotechnology. *Int J Nanomedicine* 2013, 8:3907–3915
  34. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75:843–854
  35. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ: miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006, 34:D140–D144
  36. Erson-Bensan AE: Introduction to microRNAs in biological systems. *Methods Mol Biol* 2014, 1107:1–14
  37. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ: Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004, 432:231–235
  38. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116:281–297
  39. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP: The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008, 455:64–71
  40. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009, 19:92–105
  41. Xu W, Hui C, Yu SS, Jing C, Chan HC: MicroRNAs and cystic fibrosis: an epigenetic perspective. *Cell Biol Int* 2011, 35:463–466
  42. Oglesby IK, Bray IM, Chotirmall SH, Stallings RL, O'Neill SJ, McElvaney NG, Greene CM: miR-126 is downregulated in cystic fibrosis airway epithelial cells and regulates TOM1 expression. *J Immunol* 2010, 184:1702–1709
  43. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008, 9:102–114
  44. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, Mari B, Barbry P, Mosnier JF, Hebuterne X, Harel-Bellan A, Mograbi B, Darfeuille-Michaud A, Hofman P: A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 2011, 43:242–245
  45. Di Leva G, Croce CM: miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2013, 23:3–11
  46. Leidinger P, Keller A, Meese E: MicroRNAs: important molecules in lung cancer research. *Front Genet* 2011, 2:104
  47. Dweep H, Sticht C, Gretz N: In-silico algorithms for the screening of possible microRNA binding sites and their interactions. *Curr Genomics* 2013, 14:127–136
  48. Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB: Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet* 2014, 5:23

49. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N: miRWalk—database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 2011, 44:839–847
50. Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, Christmas R, Avila-Campilo I, Creech M, Gross B, Hanspers K, Isserlin R, Kelley R, Killcoyne S, Lotia S, Maere S, Morris J, Ono K, Pavlovic V, Pico AR, Vailaya A, Wang PL, Adler A, Conklin BR, Hood L, Kuiper M, Sander C, Schmulevich I, Schwikowski B, Warner GJ, Ideker T, Bader GD: Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* 2007, 2:2366–2382
51. El-Murr N, Abidi Z, Wanherdrick K, Svrcek M, Gaub MP, Fléjou JF, Hamelin R, Duval A, Lesuffleur T: MiRNA genes constitute new targets for microsatellite instability in colorectal cancer. *PLoS One* 2012, 7:e31862
52. Kasinski AL, Slack FJ: Epigenetics and genetics: microRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011, 11:849–864
53. Meola N, Gennarino VA, Banfi S: microRNAs and genetic diseases. *Pathogenetics* 2009, 2:7
54. Han M, Zheng Y: Comprehensive analysis of single nucleotide polymorphisms in human microRNAs. *PLoS One* 2013, 8:e78028
55. Abelson JF, Kwan KY, O’Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, Mathews CA, Pauls DL, Rasin MR, Gunel M, Davis NR, Ercan-Sencicek AG, Guez DH, Spertus JA, Leckman JF, Dure LSt, Kurlan R, Singer HS, Gilbert DL, Farhi A, Louvi A, Lifton RP, Sestan N, State MW: Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette’s syndrome. *Science* 2005, 310:317–320
56. Shiohama A, Sasaki T, Noda S, Minoshima S, Shimizu N: Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 304:184–190
57. Mukherji S, Ebert MS, Zheng GX, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A: MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nat Genet* 2011, 43:854–859
58. Gillen AE, Gosalia N, Leir SH, Harris A: MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Biochem J* 2011, 438:25–32
59. Bhattacharyya S, Balakathiresan NS, Dalgard C, Gutti U, Armistead D, Jozwik C, Srivastava M, Pollard HB, Biswas R: Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8. *J Biol Chem* 2011, 286:11604–11615
60. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi LE, Cibois M, Robbe-Sermesant K, Jolly T, Cardinaud B, Moreilhon C, Giovannini-Chami L, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Waldmann R, Kodjabachian L, Barbry P: Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol* 2011, 13:693–699
61. Megiorni F, Cialfi S, Dominici C, Quattrucci S, Pizzuti A: Synergistic post-transcriptional regulation of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) by miR-101 and miR-494 specific binding. *PLoS One* 2011, 6:e26601
62. Ramachandran S, Karp PH, Jiang P, Ostedgaard LS, Walz AE, Fisher JT, Keshavjee S, Lennox KA, Jacobi AM, Rose SD, Behlke MA, Welsh MJ, Xing Y, McCray PB Jr: A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109:13362–13367
63. Hassan F, Nuovo GJ, Crawford M, Boyaka PN, Kirkby S, Nana-Sinkam SP, Cormet-Boyaka E: MiR-101 and miR-144 regulate the expression of the CFTR chloride channel in the lung. *PLoS One* 2012, 7:e50837
64. Oglesby IK, Chotirmall SH, McElvaney NG, Greene CM: Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by microRNA-145, -223, and -494 is altered in  $\Delta$ F508 cystic fibrosis airway epithelium. *J Immunol* 2013, 190:3354–3362
65. Megiorni F, Cialfi S, Cimino G, De Biase RV, Dominici C, Quattrucci S, Pizzuti A: Elevated levels of miR-145 correlate with SMAD3 down-regulation in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2013, 12:797–802
66. Viart V, Bergougnoux A, Bonini J, Varilh J, Chiron R, Tabary O, Molinari N, Claustres M, Taulan-Cadars M: Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2015, 45:116–128
67. Amato F, Seia M, Giordano S, Elce A, Zarrilli F, Castaldo G, Tomaiuolo R: Gene mutation in microRNA target sites of CFTR gene: a novel pathogenetic mechanism in cystic fibrosis? *PLoS One* 2013, 8:e60448
68. Zhong T, Perelman JM, Kolosov VP, Zhou XD: MiR-146a negatively regulates neutrophil elastase-induced MUC5AC secretion from 16HBE human bronchial epithelial cells. *Mol Cell Biochem* 2011, 358:249–255
69. Guo X, Pace RG, Stonebraker JR, Commander CW, Dang AT, Drumm ML, Harris A, Zou F, Swallow DM, Wright FA, O’Neal WK, Knowles MR: Mucin variable number tandem repeat polymorphisms and severity of cystic fibrosis lung disease: significant association with MUC5AC. *PLoS One* 2011, 6:e25452
70. Fabbri E, Borgatti M, Montagner G, Bianchi N, Finotti A, Lampronti I, Bezzeri V, Dececchi MC, Cabrini G, Gambari R: Expression of microRNA-93 and interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of pro-inflammatory responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014, 50:1144–1155
71. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008, 18:997–1006
72. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogossova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O’Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:10513–10518
73. Chung AC, Yu X, Lan HY: MicroRNA and nephropathy: emerging concepts. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2013, 6:169–179
74. Yu L, Todd NW, Xing L, Xie Y, Zhang H, Liu Z, Fang H, Zhang J, Katz RL, Jiang F: Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. *Int J Cancer* 2010, 127:2870–2878
75. Markou A, Liang Y, Lianidou E: Prognostic, therapeutic and diagnostic potential of microRNAs in non-small cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med* 2011, 49:1591–1603
76. Shah AK, Saunders NA, Barbour AP, Hill MM: Early diagnostic biomarkers for esophageal adenocarcinoma: the current state of play. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013, 22:1185–1209
77. Sita-Lumsden A, Dart DA, Waxman J, Bevan CL: Circulating microRNAs as potential new biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer* 2013, 108:1925–1930
78. Sanfiorenzo C, Ilie MI, Belaid A, Barlesi F, Mouroux J, Marquette CH, Brest P, Hofman P: Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PLoS One* 2013, 8:e54596
79. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T: Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004, 64:3753–3756
80. Keller A, Leidinger P, Bauer A, Elsharawy A, Haas J, Backes C, et al: Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nat Methods* 2011, 8:841–843

81. Ranade AR, Cherba D, Sridhar S, Richardson P, Webb C, Paripati A, Bowles B, Weiss GJ: MicroRNA 92a-2\*: a biomarker predictive for chemoresistance and prognostic for survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010, 5:1273–1278
82. Rupani H, Sanchez-Elsner T, Howarth P: MicroRNAs and respiratory diseases. *Eur Respir J* 2013, 41:695–705
83. Seto AG: The road toward microRNA therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol* 2010, 42:1298–1305
84. Davies JC, Alton EFWF: Gene therapy for cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 2010, 7:408–414
85. Zhang JT, Jiang XH, Xie C, Cheng H, Da Dong J, Wang Y, Fok KL, Zhang XH, Sun TT, Tsang LL, Chen H, Sun XJ, Chung YW, Cai ZM, Jiang WG, Chan HC: Downregulation of CFTR promotes epithelial-to-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1833:2961–2969
86. Johnson LG, Olsen JC, Sarkadi B, Moore KL, Swanstrom R, Boucher RC: Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet* 1992, 2:21–25
87. Johnson LG, Boyles SE, Wilson J, Boucher RC: Normalization of raised sodium absorption and raised calcium-mediated chloride secretion by adenovirus-mediated expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in primary human cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Clin Invest* 1995, 95:1377–1382
88. Goldman MJ, Yang Y, Wilson JM: Gene therapy in a xenograft model of cystic fibrosis lung corrects chloride transport more effectively than the sodium defect. *Nat Genet* 1995, 9:126–131
89. Ramalho AS, Beck S, Meyer M, Penque D, Cutting GR, Amaral MD: Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, 27:619–627
90. Dannhoffer L, Blouquit-Laye S, Regnier A, Chinet T: Functional properties of mixed cystic fibrosis and normal bronchial epithelial cell cultures. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009, 40:717–723
91. Ruffin M, Volland M, Marie S, Bonora M, Blanchard E, Blouquit-Laye S, Naline E, Puyo P, Le Rouzic P, Guillot L, Corvol H, Clement A, Tabary O: Anoctamin 1 dysregulation alters bronchial epithelial repair in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1832:2340–2351
92. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, Hodges MR: Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013, 368:1685–1694

# **Communications Scientifiques**

## Liste de publications

*MicroRNA-9 downregulates ANO1 chloride channel and participates to cystic fibrosis lung pathology*

**Sonneville F**, Ruffin M, Coraux C, Blouquit-Laye S, Le Rouzic P, Corvol H, Tabary O. Nature Medicine, soumis

*New insights about microRNAs in Cystic Fibrosis*

**Sonneville F**, Ruffin M, Guillot L, Rousselet N, Le Rouzic P, Corvol H, Tabary O. Am J Pathol, 2015 Apr;185(4):897-908

## Brevet

Methods and pharmaceutical composition for the treatment of Cystic Fibrosis :  
brevet international PCT/FR2015/051850.

Inventeurs : Dr Olivier Tabary et **Florence Sonneville**

Déposant : Inserm

Date de dépôt : 03 Juillet 2015

## Communications orales dans le cadre de congrès

- 7<sup>th</sup> International Conference on Drug Discovery and Therapy, 15-18 Février 2016, Dubaï (ARE)
- 29<sup>th</sup> North American Cystic Fibrosis Conference, 8-10 Octobre 2015, Phoenix (USA)
- 38<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 10-13 Juin 2015, Bruxelles (BE)
- 16<sup>èmes</sup> journées de l'école doctorale, 06 et 07 Mai 2015, Centre de recherche des Cordeliers, Paris (FR)
- 9<sup>th</sup> European CF Young Investigator Meeting, 18-20 Février 2015, Institut Pasteur, Paris (FR)
- 16<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs, Vaincre la Mucoviscidose, 17 Février 2015, Institut Pasteur, Paris (FR)
- 11<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Society Basic Science Conference, 26-29 Mars 2014, St Julians, Malte (MT)
- 15<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs, Vaincre la Mucoviscidose, 18 Février 2014, Institut Pasteur, Paris (FR)

## Communications affichées dans le cadre de congrès

- 17<sup>èmes</sup> journées de l'école doctorale, 25 et 26 Mai 2016, Centre de recherche des Cordeliers, Paris (FR)
- 17<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs, VLM, 9 Février 2013, Institut Pasteur, Paris (FR)
- 11<sup>ème</sup> séminaire du CdR de St-Antoine, 5 et 6 Novembre 2015, Fontainebleau (FR)
- German-French Lung retreat 2015 , 25-27 Mars 2015, Tegernsee, Allemagne (DE)
- 10<sup>ème</sup> séminaire du CdR de St-Antoine, 16-17 Novembre 2014, Fontainebleau (FR)
- Journées de Recherche Respiratoire – J2R 2014 (SPLF), 10-11 Octobre 2014, Bordeaux (FR)

- 15<sup>èmes</sup> journées de l'école doctorale, 22-23 Mai 2014, Centre de recherche des cordeliers, Paris (FR)
- 11<sup>th</sup> ECFS Basic Science Conference, 26-29 Mars 2014, St Julians, Malte (MT)
- 9<sup>ème</sup> séminaire du CdR de St-Antoine, 07-08 Novembre 2013, Fontainebleau (FR)
- Journées de Recherche Respiratoire - J2R 2013 (SPLF), 11-12 Octobre 2013, Montpellier (FR)
- Congrès des Jeunes Chercheurs en Biologie, 09 Octobre 2013, Institut Cochin, Paris (FR)
- 14<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs, VLM, 26 Février 2013, Institut Pasteur, Paris (FR)

## Prix

### **Mai 2016**

Prix du meilleur poster aux 17<sup>èmes</sup> journées de l'école doctorale ED394, Paris (FR)

### **Novembre 2015**

Prix du meilleur poster au 11<sup>ème</sup> séminaire du CdR de St-Antoine, Fontainebleau (FR)

### **Février 2013**

Prix du meilleur poster au 14<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs, VLM, Paris (FR)

## **Regulation of the chloride channel ANO1 by microRNA and therapeutic strategy in cystic fibrosis**

Cystic Fibrosis (CF) is the consequence of the mutation of the chloride channel CFTR. One of the therapeutic strategy proposed in CF to compensate the CFTR deficiency is to stimulate others chlorides channels. In 2008, the channel ANO1 was identified as CaCC (calcium-activated chloride channel) and then proposed as a therapeutic target in CF. Previous works from our lab have shown that ANO1 activity and expression are reduced in the CF context compared to non CF. Mechanisms of ANO1 regulation being unknown, the objectives of this work were to study ANO1 regulation by microRNA.

First, we identified a microRNA, miR-9, which is overexpressed in CF cells and directly regulates ANO1. We have then shown that ANO1 regulation by miR-9 induces decreases of ANO1 expression and activity, and migration rate of cells. In the context of CF, it seems more interesting to increase ANO1 expression in order to increase the chloride efflux, we thus designed a target site blocker (TSB ANO1) which prevents miR-9 fixation on ANO1. In different models *in vitro* and *in vivo*, we demonstrated that our TSB ANO1 increases ANO1 expression, ANO1 activity and migration rate of cells. These results suggest that ANO1 TSB could be considered as an interesting therapeutic target in CF.

## **Régulation du canal chlorure ANO1 par les microARN et stratégie thérapeutique dans la mucoviscidose**

La mucoviscidose (CF pour Cystic Fibrosis) est la conséquence de la mutation du gène codant pour le canal chlorure CFTR. Une des stratégies thérapeutiques proposées pour compenser la déficience de CFTR serait de stimuler une voie alternative à CFTR de sécrétion d'ions chlorures. En 2008, le canal ANO1 a été identifié comme CaCC (canal chlorure activé par le calcium) et alors proposé comme cible thérapeutique dans le contexte de la mucoviscidose. Des travaux précédents de notre laboratoire ont montré que l'activité et l'expression d'ANO1 étaient diminuées en contexte CF par rapport au contexte non-CF. Il a de plus été montré qu'ANO1 était impliqué dans la prolifération et la migration cellulaire qui sont des mécanismes dérégulés dans la mucoviscidose.

Les mécanismes de régulation d'ANO1 n'étant pas connus, les objectifs principaux de ce travail étaient d'étudier la régulation d'ANO1 par les microARN.

Nous avons donc, dans un premier temps, identifié un microARN, miR-9 qui est surexprimé dans les cellules CF et qui régule directement ANO1. Nous avons montré que la régulation d'ANO1 par miR-9 entraîne une diminution d'expression et d'activité d'ANO1 ainsi que de la vitesse de migration des cellules. Dans le contexte de la mucoviscidose, il nous a semblé plus intéressant de pouvoir augmenter l'expression d'ANO1 dans le but d'augmenter les efflux chlorures, nous avons donc fait synthétiser une molécule qui empêche la fixation de miR-9 à ANO1, un TSB (Target Site Blocker) ANO1. Nous avons alors démontré que l'utilisation de notre TSB ANO1 permettait d'augmenter l'expression d'ANO1, son activité chlorure et la migration cellulaire dans des cellules CF. Nous avons de plus observé une augmentation des efflux chlorures liés à ANO1 chez des souris CF traitées avec notre TSB ANO1.

L'ensemble de ses résultats suggère que notre TSB ANO1 pourrait être une cible thérapeutique intéressante chez les patients atteints de mucoviscidose.

**Mots clés : Mucoviscidose – ANO1 – miARN – Thérapeutique**

Travaux réalisés au sein du laboratoire Inserm UMR S 938 du Pr Fève – Equipe du Pr Corvol  
Centre de Recherche Saint-Antoine, 34 rue Crozatier, 75012 Paris