



HAL
open science

Le cuivre influence le stress oxydatif et l'inflammation associés à la mucoviscidose et régule la barrière jonctionnelle bronchique saine via la protéine prion cellulaire (PrPC)

Amal Kouadri

► **To cite this version:**

Amal Kouadri. Le cuivre influence le stress oxydatif et l'inflammation associés à la mucoviscidose et régule la barrière jonctionnelle bronchique saine via la protéine prion cellulaire (PrPC). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV080 . tel-01744341

HAL Id: tel-01744341

<https://theses.hal.science/tel-01744341>

Submitted on 27 Mar 2018

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **CSV/CHIMIE BIOLOGIE**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Amal KOUADRI

Thèse dirigée par Le Dr. **Mohamed BENHAROUGA**

Préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des
Métaux**

Dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Le cuivre influence le stress oxydatif et l'inflammation associés à la mucoviscidose et régule la barrière jonctionnelle bronchique saine via la protéine prion cellulaire (PrP^C)

Thèse soutenue publiquement le «**15 décembre 2017**»,
Devant le jury composé de :

Dr. Jean-Jacque FEIGE

DR-INSERM, Grenoble, Président

Dr. Lhousseine TOUQUI

DR-Pasteur, Paris, Rapporteur

Pr. Sophie THENET

DR-EPHE, Paris, Rapporteur

Dr. Christelle CORAUX

CR-INSERM, Reims, Examineur

Dr. Nadia CHERRADI

CR-INSERM, Grenoble, Examineur

Dr. Mohamed BENHAROUGA

MCU-HDR-UGA, Grenoble, Directeur de thèse



Le cuivre influence le stress oxydatif et
l'inflammation associés à la mucoviscidose et
régule la barrière jonctionnelle bronchique saine
via la protéine prion cellulaire (PrP^c)

Amal Kouadri

Automne 2017

Université Grenoble Alpes
École doctorale Chimie et Sciences du vivant



Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM)
Équipe Biologie des Métaux (BioMet)
CEA Grenoble

Thèse de doctorat en Sciences de la Vie

**Le cuivre influence le stress oxydatif et
l'inflammation associés à la mucoviscidose
et régule la barrière jonctionnelle
bronchique saine via la protéine prion
cellulaire (PrP^c)**

Amal Kouadri

Encadrant Dr. Mohamed BENHAROUGA

Automne 2017

Le cuivre influence le stress oxydatif et l'inflammation associés à la mucoviscidose et régule la barrière jonctionnelle bronchique saine via la protéine prion cellulaire (PrP^c)

Amal Kouadri © Automne 2017

Thèse de doctorat en Sciences de la Vie

Directeur de thèse : Dr. Mohamed BENHAROUGA

Université Grenoble Alpes

École doctorale Chimie et Sciences du vivant

Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM)

Équipe Biologie des Métaux (BioMet)

CEA Grenoble

17 rue des martyrs

38000 Grenoble

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Mme le Professeur Sophie THENET et Mr le Docteur Lhousseine TOUQUI de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de mon manuscrit de doctorat. Je remercie également Mme le Docteur Nadia CHERRADI, Mme le Docteur Christelle CORAUX et Mr le Docteur Jean-Jacque FEIGE qui ont accepté de faire partie de mon jury.

Merci au Docteur Nadia Alfaidy et surtout au Docteur Mohamed Benharouga pour son encadrement durant ces 3 années, pour son aide et la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux.

Ce travail ayant pu être réalisé grâce au financement de l'association Vaincre La Mucoviscidose, je remercie également tous ces membres.

J'exprime aussi ma profonde gratitude au Docteur Stéphane Ménage de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux où a été réalisée cette thèse, et à l'ensemble des permanents de tout le laboratoire, Affond, BioCat, SolHyCat, MCT et aussi et surtout BioMet.

Merci à l'ensemble des personnes qui m'ont apporté leur soutien aussi bien technique que moral qui se reconnaîtront sans mal, merci d'exister, merci d'être vous, ne changez jamais, vous êtes parfait. Enfin ces remerciements ne seraient pas complet sans ces mots de deux personnages à la simplicité et à la profondeur étonnante qui m'ont marqué et me marqueront toujours.

*You're always here to me. And I always listen.
And I can always see you.*

— $\partial^3 \sum x^2$ - to K

The name of the Doctor

” Ah non non j’pêche pas. Bah non j’aime pas ça la pêche. Ah mais c’est à cause de la canne c’est ça ? Ah non non mais c’est juste une canne et un fil, et un caillou au bout du fil pour tendre le fil. J’sais pas comment vous expliquer, ça m’détend. Y en a qui picole, d’autre qui s’battent à l’épée, moi j’fais ça. Au moins j’fais de mal à personne. Des fois j’y pense aux poissons, je me demande si ils sont pas un peu déstabilisés avec toute cette histoire. Chai pas, je me dis qui peuvent peut-être mal le prendre, ils doivent se dire « un mec qui nous appâtent avec des gadins, il nous prend vraiment pour des cons ». De toute façon je m’en fous j’viens pas pour eux, eux c’est bonjour, bonsoir et c’est tout. En fait c’est un peu pour faire comme vous. Tout le monde le sait que vous venez ici, les gens y se disent que c’est là où vous pensez au graal et tous. Comme le lac est magique, vous venez ici pour réfléchir et ça vous fait comprendre des trucs, c’est vrai ou pas ? Bah voilà ! Moi je me suis dit que si c’est ici qu’on comprend des trucs, autant que j’essaie. J’pige jamais rien à rien, c’est pas les sujets qui manquent. Moi, la canne, ça m’aide. Je visualise le caillou dans l’eau, j’ai l’impression de faire partie d’un tout, moi, le caillou, le fil, le lac, le ciel, c’est entier, vous comprenez ? C’est bien fini. C’est pour ça, moi je me dis, c’est dans ces moment-là qu’on peut bien comprendre des trucs. Vous me prenez pour un con, non ? Ah ça y’est, j’viens de comprendre à quoi ça sert la canne. En fait ça sert à rien. . . Du coup ça nous renvoie à notre propre utilité : l’Homme face à l’Absurde !

— **Perceval**

Livre IV L’Inspiration

Table des matières

Table des figures	x
Abbréviations	xii
I Introduction	1
1 Le système respiratoire	2
1.1 Trachée	3
1.2 Bronche et bronchioles	4
1.3 Alvéoles	5
2 Les épithéliums	7
2.1 Structure et fonction de l'épithélium bronchique	7
2.2 Fonction de barrière	8
2.2.1 Clairance muco-ciliaire (CM)	8
2.2.2 Sécrétion de médiateurs protecteurs	9
2.2.3 Intégrité de l'épithélium	9
2.2.4 Jonctions serrées	10
i Claudines et occludine	10
ii JAM	11
iii ZO-1	11
2.2.5 Desmosomes	12
i Desmogléines et desmocollines	12
ii Desmoplakine	13
iii Plakoglobine (ou γ -caténine)	13
2.2.6 Jonction adhérente	13
i Caténines	14
i.1 α -caténine	15
i.2 β -caténine	15
i.3 γ -caténine	15
i.4 Caténine p120	15
ii E-cadhérine	15

2.3	Pathologies pulmonaires	16
3	La mucoviscidose	17
3.1	Généralités	17
3.2	La protéine CFTR	18
3.2.1	Structure	18
3.2.2	Fonction de la protéine CFTR	20
3.2.3	Mutations au niveau du gène CFTR	21
3.2.4	Approches thérapeutiques fondamentales	23
3.3	Données cliniques	24
4	L'inflammation	26
4.1	Généralités	26
4.2	Les cellules de l'inflammation	27
4.3	Étapes de l'inflammation	28
4.3.1	Les cytokines	29
i	Cytokines de l'hématopoïèse	30
ii	Cytokines de la réponse immunitaire	30
iii	Cytokines de l'inflammation	31
4.4	Cas de la mucoviscidose	32
4.4.1	Présence du processus inflammatoire	32
i	Les neutrophiles	33
ii	Les macrophages	33
iii	Les cellules épithéliales	34
4.4.2	L'inflammation précoce	34
5	Le stress oxydatif	36
5.1	Production et fonctions des radicaux libres oxygénés (ROS)	36
5.1.1	Production des ROS (<i>Reactive Oxygen Species</i>)	36
5.1.2	Fonctions des ROS	38
5.2	Protection contre les ROS	39
5.3	Stress oxydant et mucoviscidose	40
5.3.1	Au niveau urinaire	40
5.3.2	Compartiment intracellulaire	41
i	Au niveau cytoplasmique	41
ii	Au niveau mitochondrial	42
iii	Au niveau du réticulum endoplasmique (RE)	44
iii.1	PERK	44
iii.2	ATF6	44
iii.3	IRE-1	45
5.3.3	Au niveau du plasma	47

6	La protéine prion cellulaire	51
6.1	La découverte du Prion	51
6.2	La protéine prion cellulaire (PrP ^c)	54
6.2.1	Structure de la protéine PrP ^c	54
6.2.2	Voie de synthèse, maturation et dégradation	56
6.2.3	Rôles du Prion cellulaire	58
	i Prion et jonction cellulaire	58
	ii Activité cytoprotectrice du Prion	58
	iii Prion et inflammation	60
	iv Prion et cuivre	61
II	Objectifs	63
III	Résultats	66
1	Homéostasie du cuivre et stress oxydant dans l'épithélium bronchique humain mucoviscidose : rôle dans les réponses inflammatoires	67
1.1	Introduction	67
1.2	Discussion et perspective	104
2	Effet de la correction pharmacologique versus la correction génétique sur le profile inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques homozygotes pour la mutation delF508	106
2.1	Introduction	106
2.2	Discussion et perspective	134
3	L'expression de la protéine cellulaire (PrP^c) et son importance fonctionnelle dans l'épithélium bronchique : rôle dans la protection de la barrière jonctionnelle contre le stress oxydatif.	137
3.1	Introduction	137
3.2	Discussion et perspective	180
IV	Conclusions et Perspectives	182
V	Annexes	188
	Bibliographie	202

Table des figures

1.1	Schéma et histologie de l'appareil respiratoire (d'après [1])	3
1.2	Structure schématique et histologie de la trachée (d'après [2])	4
1.3	Coupe histologique d'une bronche (d'après [3])	5
1.4	(a) Schéma de la structure des alvéoles pulmonaires, (b) Structure alvéolaire d'un tissu pulmonaire (d'après [4])	6
2.1	Structure de l'épithélium bronchique (d'après [3])	8
2.2	Schéma et résumé des différentes jonctions cellulaires et leurs fonctions (d'après [15])	9
2.3	Schémas des principales molécules des jonctions serrées (d'après [17]) .	10
2.4	Tableau des claudines exprimées dans les bronches, les alvéoles et le mésothélium (d'après [21])	11
2.5	Schémas des principales molécules des desmosomes (d'après [15]) . . .	12
2.6	Schéma des principales molécules des jonctions adhérentes (d'après [32])	14
3.1	Nombre de patients vus dans l'année et pourcentage d'adultes (d'après le registre français de la mucoviscidose)	18
3.2	Évolution annuelle des principaux indicateurs (d'après le registre français de la mucoviscidose)	18
3.3	Structure CFTR (A). Schémas de l'organisation des domaines de CFTR (d'après [51]). (B) Structure moléculaire du CFTR humain.(d'après [52])	20
3.4	Schémas de la conséquence d'un défaut de CFTR sur l'activité d'autres canaux ioniques dans (A) un épithélium sain et (B) dans un épithélium de type mucoviscidosique (d'après [63])	21
3.5	Liste des six différentes classes de mutation de CFTR et leurs conséquences cellulaires (d'après [65])	22
3.6	Mécanismes d'action et cibles des modulateurs pharmacologiques de CFTR disponibles pour les patients atteints de mucoviscidose ou en développement pré-clinique (d'après [71])	24

3.7	Organes atteints et problèmes de santé associés à la mucoviscidose (d'après [72])	25
4.1	Fonctions de différents types de cellules immunitaires (d'après [78]) . .	28
4.2	Schéma des différentes étapes de l'inflammation alvéolaire (d'après [88])	29
4.3	Liste des cytokines, de leurs fonctions, de leurs cibles et de leurs sites de sécrétion (d'après [105])	32
5.1	Les principales espèces réactives de l'oxygène (d'après [160])	37
5.2	Mécanismes de production des radicaux libres par la réaction de Fenton et de Haber-Weiss (d'après [161])	38
5.3	Liste des principaux antioxydants (d'après [165])	39
5.4	Schéma des altérations mitochondriales et leurs conséquences dans la mucoviscidose. (d'après [205])	43
5.5	Schémas générale de la réponse UPR (d'après [220])	46
5.6	Schéma simplifié de l'homéostasie du cuivre dans les cellules eucaryotes (d'après [251])	49
6.1	Liste des maladies à Prion humaines et animales (d'après [258])	51
6.2	Représentation schématique de la comparaison des structures de la PrP ^c et PrP ^{sc} (d'après Atkinson CJ., Prion. 2016;10(1) :63-82)	53
6.3	Schéma de la propagation de la PrP ^{sc} dans les cellules neuronales (d'après [274])	53
6.4	schémas de la structure primaire de la PrP ^c dans les cellules neuronales (d'après [285])	55
6.5	Schémas des différentes formes topologiques de la PrP ^c dans les cellules neuronales (d'après [285])	56
6.6	Schémas du trafic cellulaire de la PrP ^c dans les cellules neuronales (d'après [285])	57
6.7	Différentes voies de signalisation liées à la survie cellulaire dans lesquelles la protéine Prion à rôle déterminant. (d'après [319])	60
6.8	Représentation du devenir du Prion cellulaire et de sa liaison au cuivre (d'après [307])	61
0.1	Schéma récapitulatif partie I	185
0.2	Schéma récapitulatif partie II	187

Abbréviations

(Ctm)PrP ou C-transmembrane PrP

(Ntm)PrP N-transmembrane PrP

8-OHdG 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine

ABC ATP Binding Cassette

ADN Acide DésoxyriboNucléique

AMPc Adénosine Monophosphate Cyclique

AP Activator Protein

AP-1 Activator Protein 1

ARM Armadilo

ATF6 Activating Transcription Factor 6

ATP Adénosine TriPhosphate

BPCO BronchoPneumopathie Chronique Obstructive

bZIP Basic Leucine Zipper

CFTR Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CM Clairance Mucoiliaire

CSF Colony Stimulating Factor

eIF2 Eukaryotic Initiation Factor 2

ENaC Epithelil Na⁺ Channel

ERAD endoplasmique reticulum associated degradation

ERSE Endoplasmic Reticulum Stress response Element

EST Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles

GK Guanylate Kinase

GPI GlycosylPhosphatidylInisitol

GPx Gluatathion peroxydase

GRO Growth-regulated

GSH Gluthation réduit

GSSG Glutathion oxydé

H₂O₂ Peroxyde d'hydrogène

I κ B α nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

IFN Interférons

IL Interleukin

IRE-1 Inositol Requiring Enzyme 1

JAM Junctional Adhesion Molecules

JNK c-Jun N-terminal Kinase

LBA Lavage Broncho Alvéolaire

MAGUK Membrane-Associated Guanylate Kinase

MAPK Motigen-Activated Protein Kinase

MCP-1 Monocyte Chemotactic Protein 1

MIP Macrophage Inflammatory Protein

MMP Matrix MetalloProteinase

MRE Metal Responsive Element

NADPH Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NBD Nucleotide Binding Domain

NETS Neutrophil Extracellular TrapS

NF- κ B Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NGF Nerve Growth Factor

NK Natural Killer

NO oxyde nitrique

NOX NADPH oxydase

O₂^{·-} Radical superoxyde
OH[·] Radical hydroxyle
ORCC Outwardly Rectifying Chloride Channel
PDZ PSD95/dlg/ZO-1
PECAM Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PERK Potein RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PKA Protein Kinase A
PKC Protein Kinase C
PNN PolyNucléaires Neutrophiles
RE Réticulum Endoplasmique
RNS Reactive Nitrogen Species
ROMK Renal Outer Medullary Potassium Channel
ROS Reactive Oxygen Species
S1-P Site-1 Protease
S2-P Site-2 Protease
SH3 Src Homology 3
SLA Sclérose Latérale Amyotrophique
SOD SuperOxyde Dismutase
TGF Transforming Growth Factor
Th T helper
TJP Tight Junction Protein
TMD Transmembrane Domain
TNF Tumor Necrosis Factor
TRL Toll-like Receptor
UPR Unfolded Protein Response
Xbp X-box binding protein
ZO Zonula Occludens

I

Introduction

Le système respiratoire

La respiration est le berceau du rythme (Rainer Maria Rilke). En effet, nous avons besoin d'air pour vivre. L'air est composé à 78% d'azote, 21% d'oxygène et 1% de gaz rares, mais seul l'oxygène est indispensable à la vie. Pour fonctionner les cellules de l'organisme ont besoin d'énergie, cette énergie est le résultat d'une réaction chimique entre les glucides et l'oxygène contenu dans l'air. Cette réaction produit aussi du dioxyde de carbone que nous expulsions *via* le système respiratoire. L'arbre respiratoire (ou appareil respiratoire) est constitué des voies aériennes supérieures (nez, bouche, larynx), de la trachée et des poumons.

Le poumon vient juste après la trachée et constitue l'organe central de la respiration. Il est situé dans la cage thoracique au-dessus du diaphragme. Une double membrane séreuse, la plèvre pariétale, située contre la paroi thoracique, et la plèvre viscérale maintient le poumon contre la paroi thoracique.

Hors pathologies, l'homme possède deux poumons séparés l'un de l'autre par le médiastin. Le poumon dit droit est divisé en trois lobes et le gauche en deux. Chacun de ces lobes est relié à la trachée *via* une bronche souche qui se divise en bronches plus petites, puis en bronchioles à l'extrémité desquelles on retrouve les alvéoles regroupées par grappes. Les alvéoles constituent le lieu principal des échanges gazeux entre l'air qui les baigne et le sang de leurs capillaires

La proportion de cellules et l'épaisseur des épithéliums des voies respiratoires varient sous forme d'un gradient allant de cellules caliciformes et pluristratifiées vers des cellules cylindriques et uni-stratifiées. Cette transition se fait progressivement de la trachée aux alvéoles (Figure 1.1).

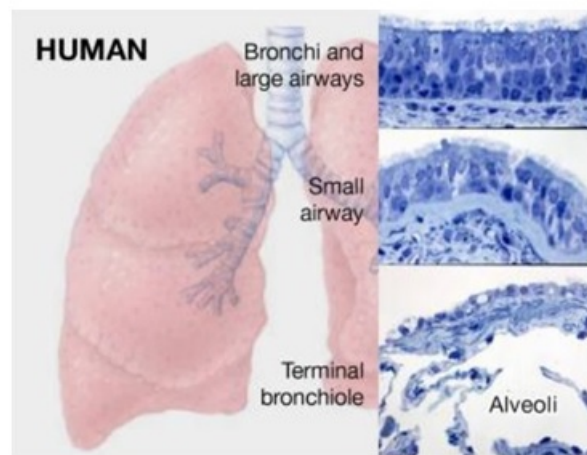
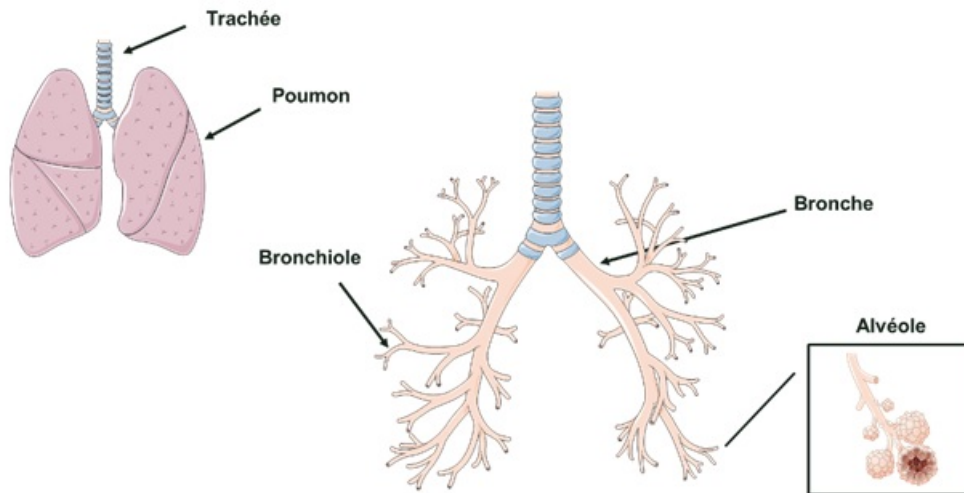


Figure 1.1: Schéma et histologie de l'appareil respiratoire (d'après [1])

1.1 Trachée

La trachée fait suite au larynx. C'est un cylindre de 10 à 12 cm de long et de 1 à 2 cm de diamètre qui se termine par une bifurcation en deux bronches principales au niveau du médiastin. La paroi trachéale est formée de trois couches (Figures 1.1 et 1.2) :

- la muqueuse de type respiratoire, comporte un épithélium pseudo-stratifié composé de cellules ciliées et de cellules caliciformes qui sécrètent le mucus. Le

chorion est riche en fibres élastique, en glandes mixtes, en tissu lymphoïde où la vascularisation est abondante et riche en nerfs. La muqueuse a pour rôle, entre autres, d'empêcher le collapsus de la paroi trachéale pendant la respiration. Elle est aussi chargée d'assurer le réchauffement, l'humidification et la filtration de l'air respiré ;

- la tunique fibrocartilagineuse est constituée d'anneaux cartilagineux dans sa partie antérieure et de bandes musculaires lisses en postérieur qui lui confèrent sa flexibilité ;
- l'adventice est un tissu conjonctif riche en vaisseaux et en nerfs.

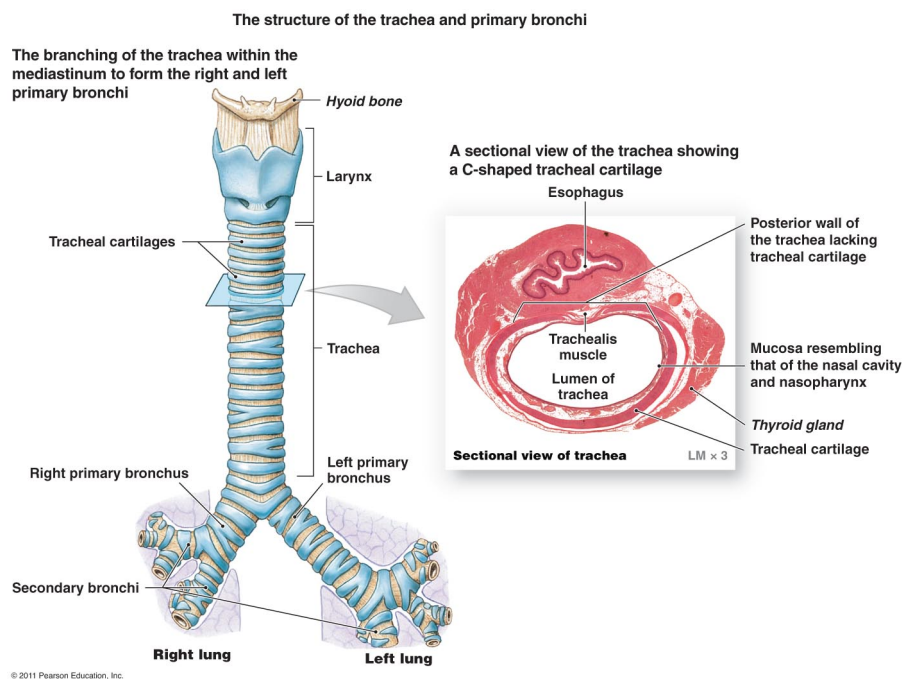


Figure 1.2: Structure schématique et histologie de la trachée (d'après [2])

La trachée assure le passage de l'air durant tout le cycle de la respiration. Elle présente aussi, en relation avec son appareil mucociliaire, une fonction de drainage permettant l'élimination des particules inhalées vers le pharynx.

1.2 Bronche et bronchioles

Les bronches primaires (ou souches) se divisent en bronches lobaires puis en bronches segmentaires pour finir par les bronchioles. D'architecture semblable à la trachée, les bronches primaires présentent un épithélium de type respiratoire identique avec

quelques différences, comme la présence d'un réseau de fibres élastiques plus important dans le chorion, qui fait office de séparation avec la sous-muqueuse laquelle contient moins de structures glandulaires et présente une discontinuité des anneaux cartilagineux.

Les bronchioles sont très fines (0,5 à 1mm de diamètre), divisées en trois types, chacune étant progressivement de plus en plus petite : les bronchioles lobaires, les bronchioles terminales et les bronchioles respiratoires. Il n'y a pas d'échange d'air dans les bronchioles lobaires et terminales ; en revanche, il y en a au niveau des bronchioles respiratoires. La fonction primaire des bronchioles est de conduire l'air des bronches aux alvéoles et de contrôler le débit d'air distribué dans le poumon par constriction ou dilatation. La structure des bronchioles est sensiblement différente des celles des bronches.

Les bronches sont entourées d'un anneau de cartilage qui les maintient ouvertes, alors que les bronchioles sont entourées d'un mur de muscle lisse permettant de dilater et de contracter les voies respiratoires. Elles contrôlent ainsi la livraison d'air aux alvéoles. La muqueuse des bronchioles est formée d'un épithélium simple cylindrique dépourvu de cellules caliciformes et pauvre en cellules ciliées. Le chorion est réduit à une fine lame élastique et la sous-muqueuse qui se confond avec l'adventice ne contient pas de glandes (Figures 1.1 et 1.3).

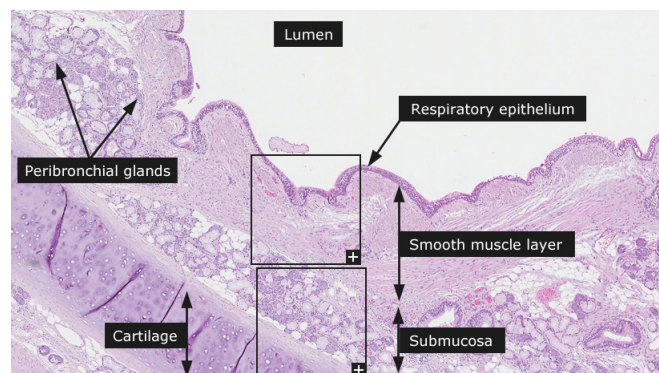


Figure 1.3: Coupe histologique d'une bronche (d'après [3])

1.3 Alvéoles

À l'aboutissement de l'arbre bronchique, on retrouve les alvéoles regroupées en acinus pulmonaires. Un acinus est constitué de 5 à 6 alvéoles entourées d'un réseau de capillaires sanguins intimement lié à la fonction des alvéoles.

L'épithélium alvéolaire est constitué de pneumocytes de type I (membraneux) et de type II (granuleux). Alors que la proportion en pneumocytes I et II est sensiblement identique, les pneumocytes de type I, du fait de leurs structures fines (0,1 à 0,2 μ m d'épaisseur) et étalées, couvrent 95% de la surface alvéolaire. Ceci a pour conséquence de conférer à l'épithélium alvéolaire une caractéristique souple très étendue qui favorise les échanges gazeux, mais aussi très fragile qui le rend vulnérable aux attaques microbiennes et aux polluants.

La barrière alvéolo-capillaire, au travers de laquelle est assurée la fonction d'échanges gazeux, est formée de pneumocytes de type I des alvéoles et des cellules endothéliales des capillaires. Les pneumocytes de type II sont de forme cubique et présentent une microvillosité au niveau de leur pôle apical. Leur aspect granuleux est dû à leur cytoplasme riche en organites, dont un spécifique, les corps lamellaires, qui sécrète le surfactant pulmonaire. De plus, ils présentent un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi surdéveloppés, signe d'un métabolisme très actif. Le surfactant sécrété (et aussi recyclé) par les corps lamellaires des pneumocytes de type II a pour fonction de fluidifier le mucus, de faciliter les échanges gazeux et de diminuer la tension de surface des alvéoles afin qu'elles ne s'effondrent pas sur elles-mêmes pendant la respiration et qu'elles conservent leur élasticité (Figures 1.1 et 1.4).

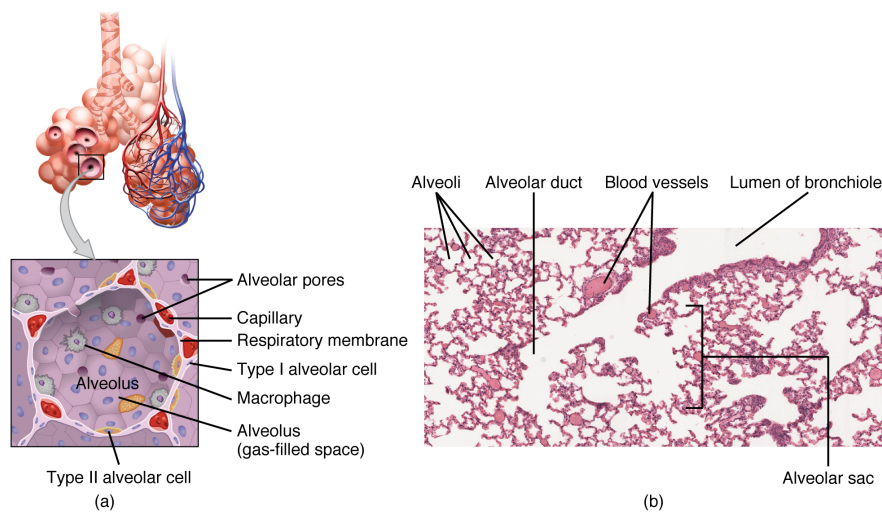


Figure 1.4: (a) Schéma de la structure des alvéoles pulmonaires, (b) Structure alvéolaire d'un tissu pulmonaire (d'après [4])

Les épithéliums

Dans les épithéliums, tissus très organisés, les cellules ne fonctionnent pas seules : elles sont regroupées en tissus conjonctif, musculaire, nerveux et épithélial. Les cellules épithéliales forment une barrière protectrice qui recouvre tous les tissus qui sont en contact avec le monde extérieur en séparant physiquement l'organisme de celui-ci. Plutôt que d'être une barrière statique et impénétrable, les épithéliums sont des structures dynamiques qui ajustent leurs proliférations, leurs différenciations et leurs morts cellulaires en réponse à des signaux intrinsèques et extrinsèques. Un épithélium est composé de cellules contiguës, reliées les unes aux autres par des jonctions. Les tissus épithéliaux recouvrent les organes comme la peau, les voies respiratoires et l'appareil reproducteur. Comme les structures des épithéliums sont différentes en fonction de leur localisation et de leur rôle dans l'organisme, dans la partie suivante ne seront détaillées que la structure et la fonction de l'épithélium bronchique.

2.1 Structure et fonction de l'épithélium bronchique

L'épithélium bronchique est à l'interface entre le système respiratoire et l'air que l'on inspire. Il repose sur un tissu conjonctif constitué d'une membrane basale, d'une lamina propria et d'une sous-muqueuse, qui contient du muscle lisse, des glandes et du cartilage [5]. L'épithélium bronchique est composé de trois types de cellules qui forment ensemble une couche ciliée pseudo-stratifiée (Figures 1.3 et Figure 2.1) :

- les cellules ciliées cylindriques dont la principale fonction est d'éliminer les particules grâce à leur capacité de clairance muco-ciliaire ;
- les cellules sécrétoires présentes sous plusieurs formes, représentent environ 20% de l'épithélium bronchique. Les cellules caliciformes sont les principaux producteurs de mucus des voies aériennes, dans lequel les particules inhalées, ainsi que les virus et les bactéries, peuvent être piégés [6]. Les cellules de Clara (ou pneumocytes de type II granulaire) produisent le surfactant. De plus, ces cellules peuvent participer à l'élimination des agents nocifs. Les cellules de Clara

sont prédominantes dans les bronchioles et les cellules caliciformes dans les voies aériennes plus larges ;

- les cellules basales sont considérées comme les cellules souches de l'épithélium bronchique.

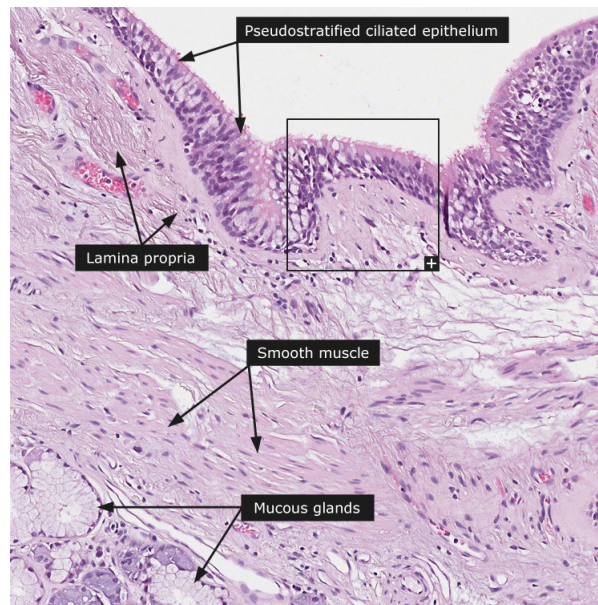


Figure 2.1: Structure de l'épithélium bronchique (d'après [3])

2.2 Fonction de barrière

Les cellules de l'épithélium bronchique défendent les voies aériennes contre l'entrée de pathogènes. Cette défense repose à la fois sur l'intégrité de l'épithélium qui forme une barrière physique, sur la sécrétion du mucus et sur la fonction ciliaire dont l'action commune permet une clairance muco-ciliaire efficace contre différents agents extérieurs. Les cellules de l'épithélium bronchique sont aussi capables de synthétiser et de sécréter différents médiateurs dont le rôle principal est la défense de l'intégrité épithéliale.

2.2.1 Clairance muco-ciliaire (CM)

Les particules inhalées sont piégées dans le mucus puis éliminées des voies aériennes par la CM grâce aux battements coordonnés des cils. La CM est facilitée par la sécrétion d'agent surfactant par les cellules de Clara ou caliciformes. La fonction muco-ciliaire

est régulée par divers facteurs tels que la bradykinine, l’histamine et les cytokines [7–10] .

2.2.2 Sécrétion de médiateurs protecteurs

Pour assurer la protection contre les pathogènes, l’épithélium bronchique sécrète un certain nombre de médiateurs comprenant des substances antibactériennes, des anti-protéases, des antioxydants (glutathion, superoxyde dismutase et catalase) et des médiateurs de l’inflammation tels que les interleukines [11–13].

2.2.3 Intégrité de l’épithélium

L’intégrité physique de l’épithélium est maintenue par plusieurs mécanismes d’adhérence [14]. Les jonctions serrées sont une structure étroite en forme de couronne entourant chaque cellule au pôle apical. Les desmosomes et les jonctions adhérentes sont impliquées dans le maintien d’une forte adhérence cellule-cellule. L’ensemble de ces jonctions forment une barrière physique, empêchant les «fuites» (Figure 2.2). En plus de ces jonctions, il y a les jonctions GAP de communication et les hémidesmosomes qui servent à l’ancrage des cellules épithéliales à la lame basale.

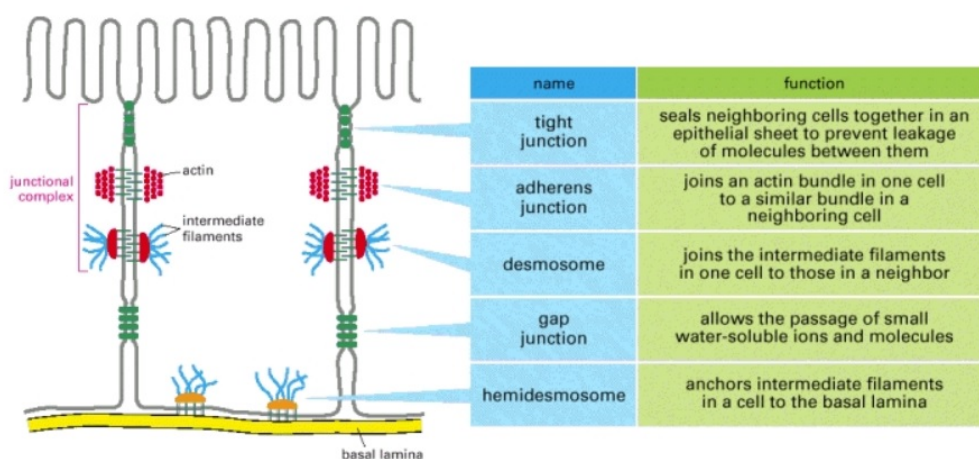


Figure 2.2: Schéma et résumé des différentes jonctions cellulaires et leurs fonctions (d’après [15])

2.2.4 Jonctions serrées

Au niveau des jonctions serrées, les cellules sont maintenues étroitement l'une contre l'autre par des groupes de protéines appelées claudines, chacune interagissant avec un groupe partenaire au niveau de la membrane plasmique opposée. Ces groupes sont organisés en réseaux dont le degré de densité est proportionnel à l'étanchéité de l'épithélium. Le but des jonctions serrées est d'agir comme une barrière imperméable et d'empêcher les liquides de s'échapper entre les cellules. À côté des claudines, on trouve l'occludine, protéine transmembranaire dont la fonction principale est encore très étudiée et les protéines JAM (*Junctional Adhesion Molecules*). Claudines, occludine et JAM s'associent aux protéines intracellulaires de la membrane périphérique appelées protéines ZO-1 (*Zonula occludens 1*) qui s'ancrent au cytosquelette d'actine [15, 16] (Figure 2.3).

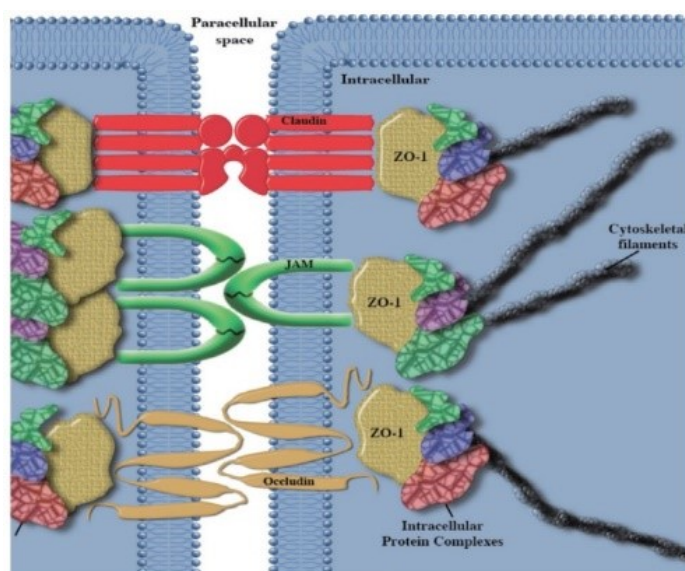


Figure 2.3: Schémas des principales molécules des jonctions serrées (d'après [17])

i Claudines et occludine

Protéines majeures des jonctions serrées, claudines et occludine possèdent deux domaines extracellulaires en forme de boucle qui interagissent avec les claudines et occludine de la cellule voisine, et quatre domaines transmembranaires dont les extrémités sont cytoplasmiques. La famille des claudines compte une vingtaine de membres, chacun spécifique d'un tissu et dont plusieurs, au moins deux différents, sont exprimés dans chaque jonction. Leurs extrémités cytoplasmiques interagissent

avec des partenaires protéiques comme les ZO ce qui leur permet d'être reliées au cytosquelette d'actine. Les claudines 1, 3, 4, 5, 7, 8 et 18 sont exprimées dans les bronches et bronchioles humaines. Il existe des rapports divergents pour l'expression de la claudine 2 [18–21] (Figure 2.4).

Table 1 Claudin expression in bronchial, alveolar and mesothelial cells

	Claudin protein or mRNA expression	Reference
Bronchial cells	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8* , 18*	[14-18,81,82]
Alveolar cells type 2	2, 3, 4,5,7 , 18 1*	[15-18,25-27,81]
Alveolar cells type 1	1,3,4,5,7,8,18	[27,68,26]
Mesothelial cells	1,2, 3,5,7	[104,107]

* = only mRNA expression found
bold = both mRNA and protein expression found
normal text = only protein expression found

Figure 2.4: Tableau des claudines exprimées dans les bronches, les alvéoles et le mésothélium (d'après [21])

ii JAM

Protéines transmembranaires possédant deux boucles de type immunoglobulines extracellulaires les JAM présentent un domaine transmembranaire et une partie C-terminale intracellulaire. Il existe trois isoformes de JAM : JAM-A, -B et -C. Les JAM possèdent tous un domaine PDZ en C-terminale indispensable à la liaison avec les ZO [22].

iii ZO-1

La protéine *Zonula occludens-1* (appelée aussi TJP-1 pour *Tight Junction Protein-1*) se lie aux extrémités cytoplasmiques des claudines, occludine et JAM. Elle interagit aussi avec la F-actine au niveau du cytosquelette. Elle appartient à la famille des protéines MAGUK (*Membrane-Associated Guanylate Kinase*) et est constituée de trois domaines distincts, PDZ (PSD95/dlg/ZO-1), SH3 (*Src homology 3*) et GK (*Guanylate Kinase*), ainsi que d'une région C-terminale plus ou moins longue, ZO-1 possédant la plus longue [23, 24].

2.2.5 Desmosomes

Les desmosomes forment des zones de contact ponctuelles entre les cellules épithéliales adjacentes. C'est un complexe de protéines dont certaines s'étendent au travers de la membrane cellulaire tandis que d'autres ont pour fonction d'ancrer la jonction dans la cellule. Des protéines d'adhérence spécialisées, la desmogléine et la desmocolline, toutes deux membres de la famille des cadhérines, se trouvent sur les membranes des deux cellules et interagissent dans l'espace entre les cellules. À l'intérieur de la cellule, les cadhérines s'attachent à une structure appelée plaque cytoplasmique qui contient en particulier de la plakoglobine et des desmoplakines. Ces dernières sont liées aux filaments intermédiaires qui participent à l'ancrage de la jonction. Les desmosomes fixent les cellules adjacentes ensemble, en veillant à ce que les cellules des organes et des tissus qui s'allongent, comme par exemple les poumons, restent connectées [15] (Figure 2.5).

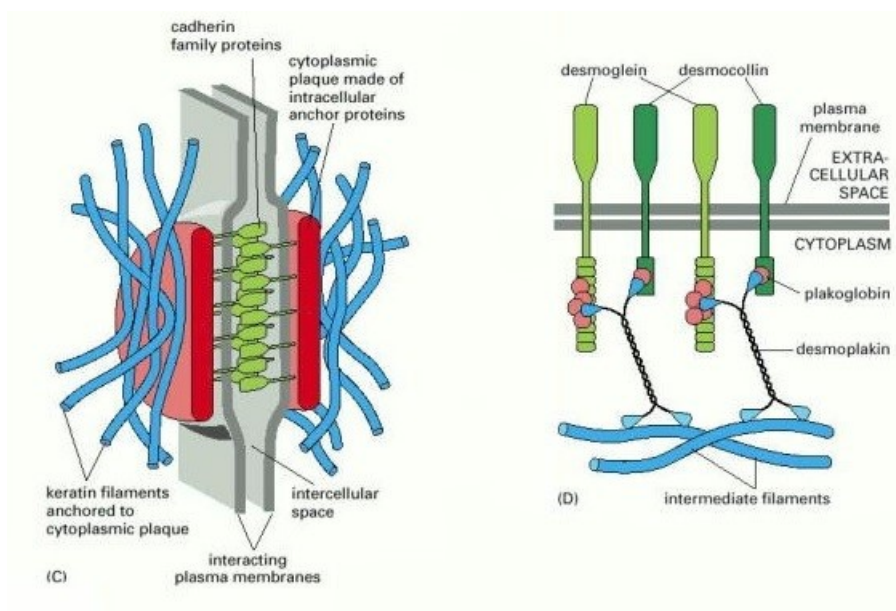


Figure 2.5: Schémas des principales molécules des desmosomes (d'après [15])

i Desmogléines et desmocollines

Les desmogléines et les desmocollines sont des cadhérines. Comme toutes les cadhérines elles portent des domaines de liaison au calcium (dont dépend leur fonctionnement). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires qui possèdent une extrémité

N-terminale extracellulaire où se situent les sites de fixation au calcium et une extrémité C-terminale cytoplasmique. Le calcium est nécessaire à la reconnaissance et à la liaison de cadhérines entre elles [25–27]. La particularité de la desmogléine et de la desmocolline est qu'elles sont capables de faire des liaisons avec des cadhérines différentes (liaisons hétérophiliques), elles sont par la suite ancrées sur une plakoglobine, puis une desmoplakine, et enfin au filament intermédiaire du cytosquelette [28].

ii Desmoplakine

La desmoplakine est une protéine importante du desmosome qui sert à maintenir l'intégrité structurale de la jonction. La desmoplakine existe sous deux isoformes la première connue sous le nom de « DPII » de 260,0kDa et la seconde appelée « DPI » de 332,0kDa, quasiment identiques à l'exception d'un domaine plus court dans la DPII. La desmoplakine ancre les filaments intermédiaires aux plaques desmosomales [28].

iii Plakoglobine (ou γ -caténine)

La plakoglobine également appelée γ -caténine, est un membre de la famille des caténines, homologue à la β -caténine puisqu'elle contient elle aussi un motif d'acides aminés répété distinctif appelé répétition Armadillo (ARM). La plakoglobine est un composant cytoplasmique des desmosomes et des jonctions adhérentes. Elle possède, en plus du domaine ARM, des domaines globulaires N-terminaux et C-terminaux de structures inconnues. Elle a été initialement identifiée comme composant des desmosomes, où elle peut se lier aux membres de la famille des cadhérines ainsi qu'aux cadhérines classiques telles que la E-cadhérine ; dans ce cas elle, est appelée γ -caténine [29]. Comme la β -caténine elle serait impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire [30].

2.2.6 Jonction adhérente

La jonction adhérente a plusieurs fonctions dont l'initiation et la stabilisation de l'adhésion cellule-cellule, la régulation du cytosquelette d'actine, la signalisation intracellulaire et la régulation de la transcription. Le cœur de la jonction adhérente est constitué d'interactions entre des glycoprotéines transmembranaires de la superfamille

des cadhérines, tels que l'E-cadhérine et des protéines d'ancrage trouvées à l'intérieur de la cellule membres de la famille des caténines comme l' α -caténine, la β -caténine, la caténine p120 et la γ -caténine. Ensemble, ces protéines contrôlent la formation, la maintenance et la fonction des jonctions adhérentes [15, 16, 31]. La jonction adhérente est constituée des protéines d'ancrage trouvées à l'intérieur de la cellule telles que l' α -caténine, la β -caténine, la caténine p120 et la γ -caténine. Ces protéines d'ancrage relient les microfilaments d'actine aux cadhérines, comme la E-cadhérine, protéine d'adhérence transmembranaire localisée en grande partie dans l'espace extra-cellulaire. Dans l'espace interjonctionnel, l'interaction entre deux cadhérines se fait grâce au calcium *via* leurs extrémités extra-cellulaires. Ces deux cadhérines utilisent leurs extrémités intracellulaires pour interagir avec les protéines de caténine localisées dans le cytoplasme des deux cellules adjacentes pour former le complexe cadhérine-caténine. Ce complexe se lie à l' α -actinine et à la vinculine qui relient le complexe cadhérine-caténine au microfilament d'actine de la cellule (Figure 2.6)

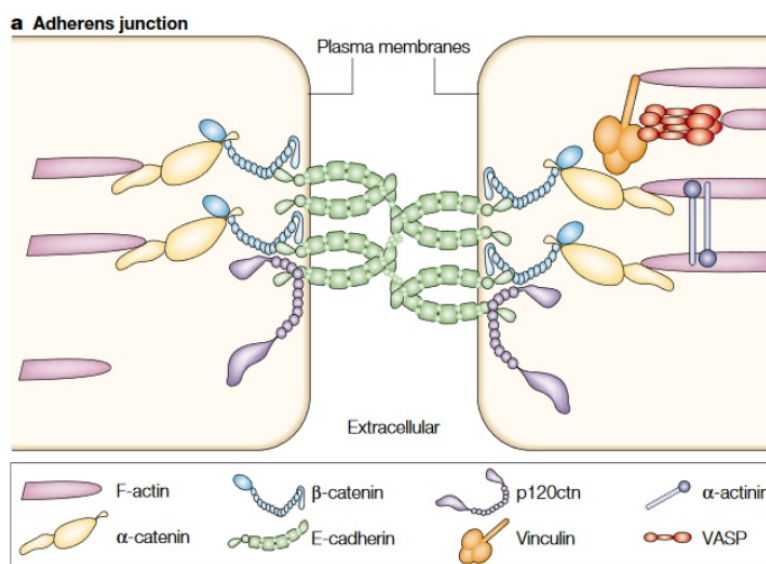


Figure 2.6: Schéma des principales molécules des jonctions adhérentes (d'après [32])

i Caténines

La fonction primaire des caténines est de connecter les cadhérines aux filaments d'actine du cytosquelette dans les jonctions adhérentes, mais elles peuvent aussi, dans le cas de la β -caténine par exemple, jouer un rôle dans la signalisation cellulaire et la transcription. L' α -caténine, la caténine p120, la β -caténine et la γ -caténine sont toutes

membres de cette famille. Seules la β -caténine et la γ -caténine sont en interaction directe avec la partie cytoplasmique des cadhérines [27].

i.1 α -caténine L' α -caténine se lie avec une faible affinité aux filaments d'actine et au complexe E-cadhérine- β -caténine. Lorsque l' α -caténine n'est pas dans un complexe moléculaire avec la β -caténine, elle se dimérise pour réguler l'assemblage des filaments d'actine [33]. Mais des études récentes montrent qu'elle ne peut pas se lier simultanément à la β -caténine et au cytosquelette d'actine [34, 35].

i.2 β -caténine La β -caténine est une protéine impliquée dans la régulation de l'adhésion cellulaire et dans la transcription de certains gènes. Elle est par exemple un élément important dans la voie de signalisation Wnt. La β -caténine possède une structure homologue à la γ -caténine. Comme cette dernière, son cœur consiste en 12 répétitions (ARM), chacune d'environ 40 acides aminés, qui se plient ensemble en un domaine protéique rigide avec une forme allongée, ainsi qu'un domaine N- et C-terminal globulaire de structure inconnue. Elle est largement exprimée dans de nombreux tissus [16].

i.3 γ -caténine Voir 2.2.5 iii Plakoglobine page 13

i.4 Caténine p120 La caténine p120 est un membre de la sous-famille des protéines à domaine Armadillo. Contrairement aux caténines classiques (α -caténine, β -caténine et γ -caténine) qui ont fait l'objet d'études approfondies, la fonction biologique de p120 n'a émergé que récemment et son rôle reste toujours à identifier. Néanmoins, il est clair que p120 est une protéine des jonctions adhérentes grâce à son domaine d'interaction avec les cadhérines [36]. De plus elle stabiliserait la E-cadhérine en la protégeant de la dégradation protéique afin de maintenir sa localisation membranaire [37, 38].

ii E-cadhérine

Elle est la cadhérine classique de type I la plus étudiée et la protéine la plus importante des jonctions adhérentes. La E-cadhérine présente la même structure générale que la desmoglérine et la desmocolline. Dans le cas de jonctions adhérentes, les cadhérines simples, comme la E-cadhérine, sont en interaction avec des caténines intracellulaires

(α -, β - et γ -caténine) qui servent d'intermédiaires de liaison avec les filaments d'actine du cytosquelette.

2.3 Pathologies pulmonaires

Malgré l'ensemble des éléments de protections disponibles dans l'épithélium bronchique, décrits précédemment, il peut arriver que ce ne soit pas suffisant pour lutter contre les maladies. Les maladies pulmonaires ont essentiellement des causes infectieuses (bactéries, virus ou champignons pathogènes), la plus fréquente étant le pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) qui est aussi le plus dangereux. Parmi les pathologies pulmonaires fréquentes on trouve l'asthme, les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) caractérisées par un rétrécissement irréversible des bronches, les cancers et la mucoviscidose, maladie génétique caractérisée par une production importante d'un mucus épais qui entraîne d'importants troubles respiratoires. On peut en citer beaucoup d'autres, mais c'est sur cette dernière pathologie que notre étude s'est concentrée.

La mucoviscidose

3.1 Généralités

La mucoviscidose est une maladie génétique, à transmission autosomique, récessive, et multiviscérale particulièrement fréquente dans la population caucasienne. La mucoviscidose est causée par des mutations identifiées sur le gène CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Le gène CFTR est localisé sur le bras long (appelé q) du chromosome 7 à la position 31.2 (7q31.2) [39] et code pour une glycoprotéine membranaire appelée CFTR exprimée au pôle apical de la majorité des cellules épithéliales.

C'est en 1938 à la suite d'autopsies d'enfants souffrant de malnutrition, que pour la première fois la distinction est établie entre la maladie coéliquaue et la mucoviscidose définie à l'époque par le terme de « fibrose cystique du pancréas ». Elle est décrite comme une maladie caractérisée par une mauvaise absorption des graisses et des protéines, une stéatorrhée (quantité élevée de lipides dans les selles), un retard de croissance et des infections pulmonaires [40]. Ce n'est qu'en 1943 qu'elle est renommée « mucoviscidose » afin de rendre compte de l'état visqueux du mucus observé dans plusieurs organes autres que le pancréas [41]. En 1948, lors de la vague de chaleur à New York, un jeune pédiatre, Paul di Sant'Agnese, constate que beaucoup de nourrissons atteints de mucoviscidose présentaient une prostration due à la chaleur. Il émet l'hypothèse d'un problème de sudation et démontra par la suite la présence d'un excès d'ions sodium (Na^+) et chlorure (Cl^-), dont les concentrations sont cinq fois plus élevées dans la sueur de patients atteints de mucoviscidose [42]. C'est grâce à cette découverte qu'est mis au point un peu plus tard le test de la sueur, toujours utilisé de nos jours pour diagnostiquer les patients atteints de mucoviscidose [43].

Selon le registre français de la mucoviscidose, on comptait un peu plus de 6000 patients recensés en 2014. Ce nombre, en constante progression depuis le début du recensement en 1992, compte pour la deuxième fois consécutive plus d'adultes que d'enfants, même si la population reste jeune avec un âge moyen d'environ 20 ans (Figures 3.1 et 3.2).

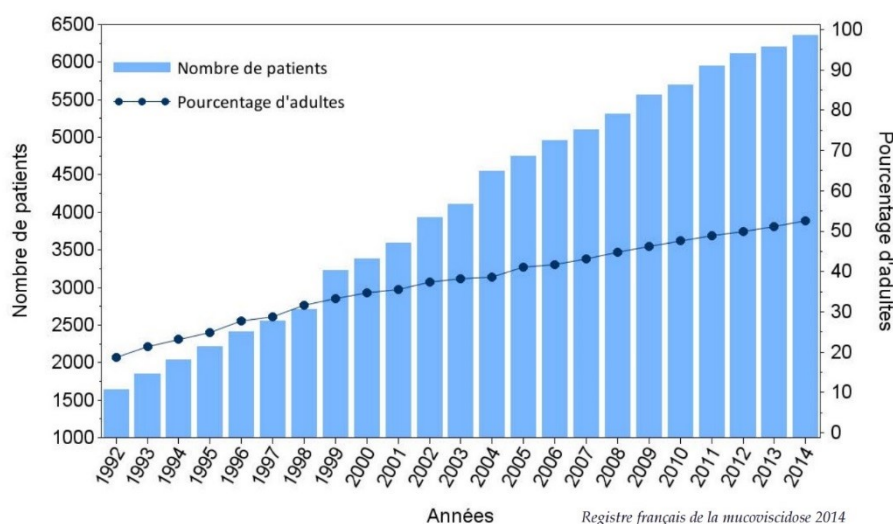


Figure 3.1: Nombre de patients vus dans l'année et pourcentage d'adultes (d'après le registre français de la mucoviscidose)

Indicateurs	Années d'enquête									
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
Patients recensés*	4966	5113	5316	5578	5712	5999	6161	6259	6412	
Patients vus dans l'année**	4956	5099	5305	5560	5698	5948	6115	6206	6356	
Enfants	2895	2903	2929	2989	2985	3036	3069	3028	3017 (47.5 %)	
Adultes	2061	2196	2376	2571	2713	2912	3046	3178	3339 (52.5 %)	
+ de 40 ans	193	221	264	325	355	411	464	517	590 (9.3 %)	
Hommes	2569	2669	2757	2882	2930	3079	3164	3214	3290 (51.8 %)	
Femmes	2387	2430	2548	2678	2768	2869	2951	2992	3066 (48.2 %)	
Age moyen (années)	16.9	17.3	17.8	18.3	18.6	19.2	19.7	20.2	20.8	
Age médian (années)	15.6	15.9	16.3	16.7	17.1	17.5	17.9	18.4	18.9	
Age minimum (années)	0.1	0.1	0	0	0	0	0.1	0.1	0.1	
Age maximum (années)	76.7	77.7	78.7	79.7	80	88	86.8	82.5	82.8	

*Patients pour lesquels le statut vital est connu, qu'ils aient été vus ou non par un centre.

**Patients de référence pour les statistiques figurant dans ce rapport, hormis les données sur les décès.

Note : les patients avec un diagnostic douteux ont été retirés des analyses (80 patients en 2014).

Figure 3.2: Évolution annuelle des principaux indicateurs (d'après le registre français de la mucoviscidose)

3.2 La protéine CFTR

3.2.1 Structure

CFTR est une glycoprotéine transmembranaire constituée de 1480 acides aminés et possédant un poids moléculaire d' 170kDa [39]. Elle appartient à la superfamille

des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) et plus précisément à la sous-famille ABCC (ABCC7). La famille des protéines transporteurs ABC est extrêmement vaste ; on les retrouve dans l'ensemble du vivant aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes [44]. Ces protéines lient et hydrolysent l'ATP, étape nécessaire à leur activation, permettant ainsi d'assurer des échanges unidirectionnels d'éléments divers (ions, substrats, macromolécules. . .) au travers des membranes cellulaires [45]. Les transporteurs ABC sont constitués de quatre domaines :

- deux domaines cytoplasmiques de liaison/hydrolyse des nucléotides : NBD (*Nucleotide Binding Domains*). Les NBD possèdent trois motifs très conservés, les motifs Walker A et B de fixation de l'ATP et un motif dit « signature » LSGGQ, spécifique des transporteurs ABC, situé entre les motifs de Walker A et B [46]. Le passage des éléments à travers la membrane cellulaire se fait généralement grâce à l'énergie résultant de l'hydrolyse de l'ATP [47] ;
- deux domaines transmembranaires : TMD (*TransMembrane Domain*) (TMD1 et TMD2) constitués chacun de six segments transmembranaires, (TM : transmembrane) allant de TM1 à TM6 pour TMD1 et de TM7 à TM12 pour TMD2, dont la nature dépend de l'élément transporté.

CFTR contient aussi trois domaines intracellulaires : deux domaines NBD (NBD1 et NBD2) et un domaine régulateur (R) reliant le NBD 1 au TMD2 et possédant de nombreux sites de phosphorylation [48] (Figure 3.3) . Le domaine R est codé par un exon unique, le 13^{ème} exon spécifique à la protéine CFTR. Afin de permettre l'ouverture du canal CFTR par le MgATP, la phosphorylation du domaine R par les protéines kinases A et C (PKA, PKC) est une étape primordiale. On retrouve aussi, au niveau de la 4^{ème} boucle extracellulaire reliant les segments TM7 et TM8 deux sites de N-glycosylation au niveau des asparagines 894 et 900 (N894 et N900). La grande majorité de la protéine (environ 80 %) est cytoplasmique, y compris ses domaines N et C terminaux, le reste étant soit transmembranaire (16 %) soit extracellulaire (4 %) [49, 50].

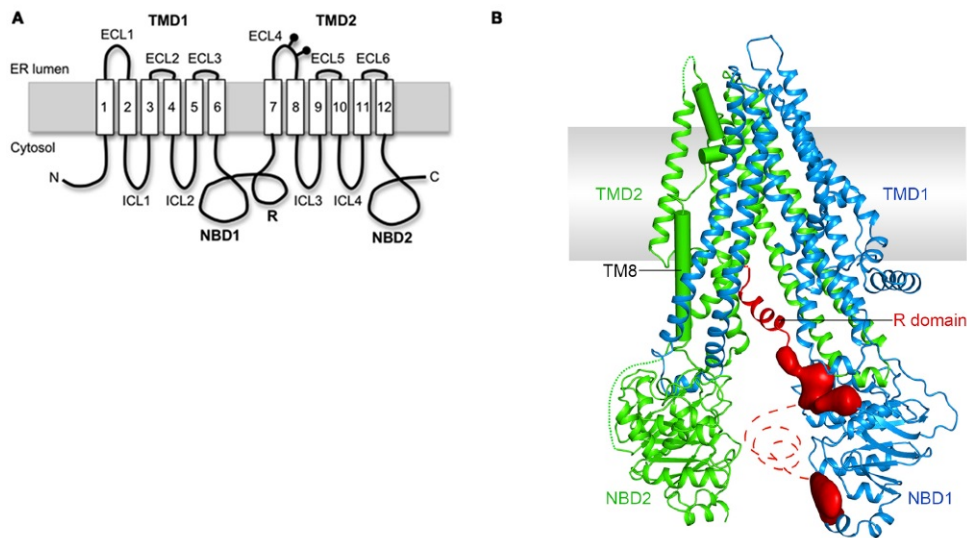


Figure 3.3: Structure CFTR (A). Schémas de l'organisation des domaines de CFTR (d'après [51]). (B) Structure moléculaire du CFTR humain.(d'après [52])

3.2.2 Fonction de la protéine CFTR

La protéine CFTR forme un canal anionique permettant la diffusion passive des ions Cl^- indépendamment du voltage cellulaire, mais dépendant de l'AMPc (phosphorylation *via* PKA et PKC), et de la fixation et l'hydrolyse de l'ATP [53, 54]. Le mécanisme de sélectivité anionique est lié aux segments transmembranaires TM1 et TM6 [55, 56]. La séquence de sélectivité du canal CFTR est : Br^- (Bromure) $>$ Cl^- (Chlorure) $>$ I^- (Iodure) $>$ F^- (Fluorure). Cette perméabilité au ions Cl^- plus importante que celle des ions I^- permet de discriminer CFTR des autres canaux Cl^- [57].

Malgré une sélectivité plus grande pour les anions, CFTR semble être perméable au tripeptide glutathion (GSH) qui est l'antioxydant le plus abondamment retrouvé dans les cellules pulmonaires [58]. CFTR est une protéine régulatrice de l'activité d'autres canaux ioniques. Ainsi, il a été montré que la présence de CFTR est indispensable à l'activation du canal ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*) par les PKA [48]. De plus, CFTR régule négativement le canal sodique ENaC (*Epithelial Na^+ Channel*) [48]. L'absence de l'activité canal Cl^- associée à CFTR a pour conséquence une hyper-absorption de Na^+ , ce qui participe à la déshydratation du mucus [59]. En outre, CFTR régule négativement l'activité des canaux potassiques ROMK (*Renal Outer Medullary Potassium Channel*) [60]. Il a également été démontré que la protéine CFTR régule positivement l'activité de certaines aquaporines qui participent activement à l'hydratation du mucus [61, 62] (Figure 3.4).

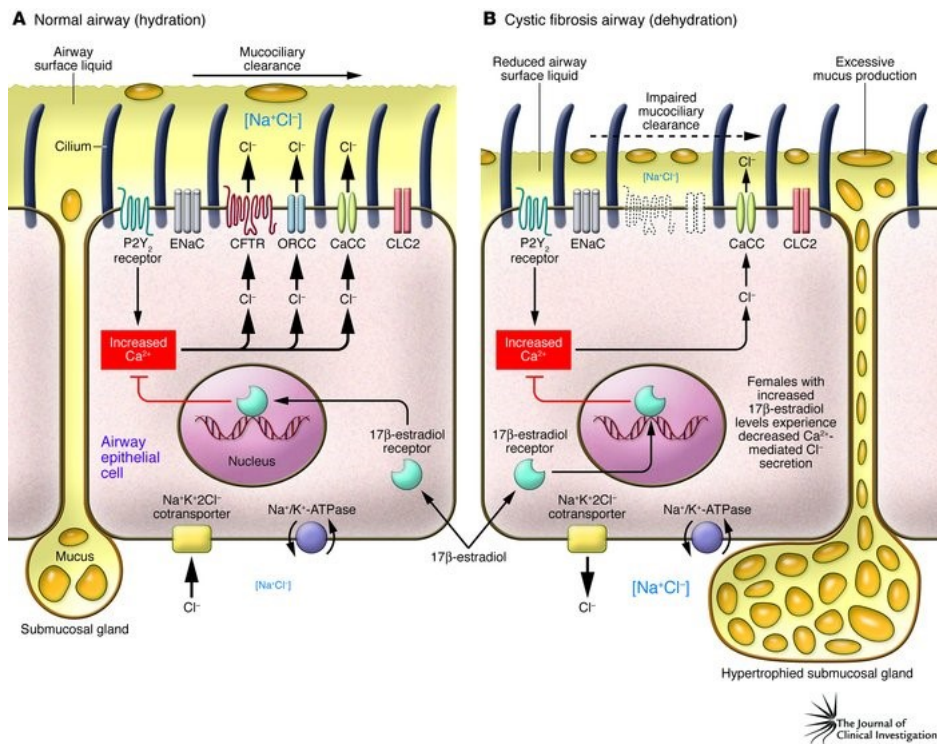


Figure 3.4: Schémas de la conséquence d'un défaut de CFTR sur l'activité d'autres canaux ioniques dans (A) un épithélium sain et (B) dans un épithélium de type mucoviscidose (d'après [63])

En conclusion, l'expression apicale de CFTR au niveau des cellules épithéliales des conduits bronchiques, digestifs et reproducteurs ainsi que son rôle important, direct ou indirect, dans la régulation du transport ionique et hydrique permettent la production d'un fin mucus qui participe au bon fonctionnement des voies aériennes, ainsi que des systèmes digestif et reproducteur.

3.2.3 Mutations au niveau du gène CFTR

Aujourd'hui, plus de 2000 mutations ont été identifiées sur le gène CFTR. Les plus fréquentes sont les mutations faux-sens (48,7 %), suivies par les mutations dues aux modifications du cadre de lecture causées par une petite insertion ou délétion (19,5 %), puis les mutations altérant des codons essentiels pour l'épissage (15,7 %) et enfin des mutations non-sens (12,9 %) [http://www.genet.sickkids.on.ca]. En fonction du comportement cellulaire de CFTR, ces mutations ont été classées en six classes [64]. Les trois dernières classes sont associées à un phénotype mucoviscidose modéré, les trois premières quant à elles, sont beaucoup plus sévères (Figure 3.5).

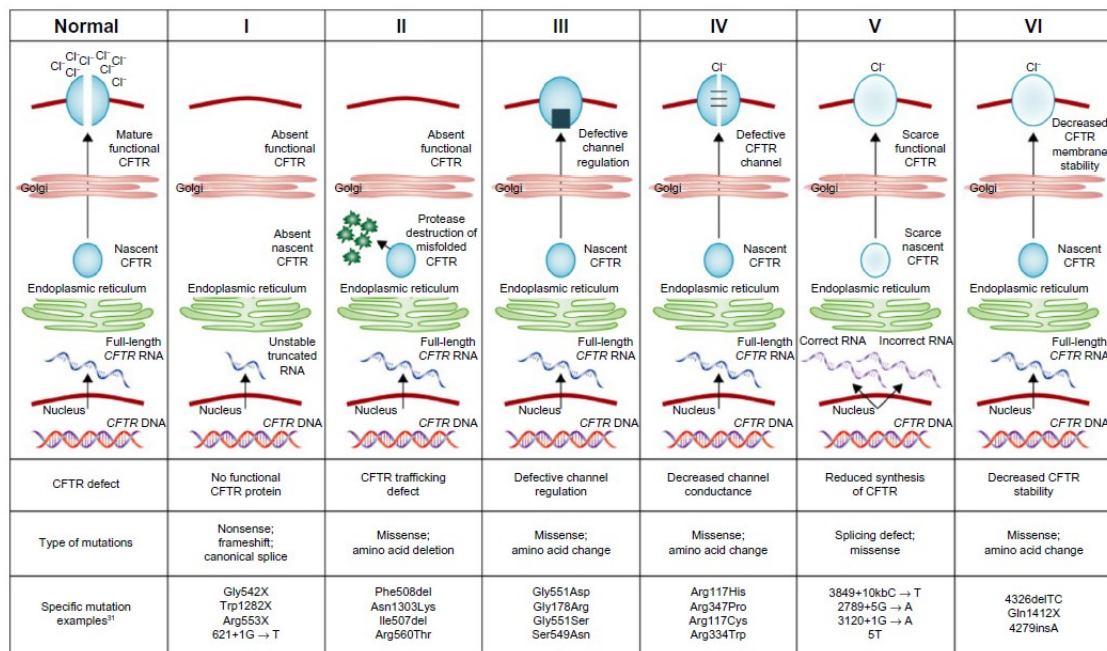


Figure 3.5: Liste des six différentes classes de mutation de CFTR et leurs conséquences cellulaires (d'après [65])

- Les mutations de classe I conduisent à un défaut de production de la protéine CFTR qui est complètement absente, ce sont les deuxièmes mutations les plus fréquentes.
- Les mutations de classe II conduisent à un défaut de maturation de CFTR, ce qui a pour conséquence d'affecter l'adressage de la protéine du réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi. Ceci est dû à une mauvaise glycosylation et à un mauvais repliement (changement dans la structure tertiaire) de la protéine CFTR. Bien qu'elle soit partiellement fonctionnelle, CFTR est alors reconnue et dégradée par le système de dégradation ubiquitine/protéasome [64]. La mutation delF508, qui correspond à la délétion d'un résidu phénylalanine à la position 508 de la protéine CFTR, est de loin la plus fréquente (environ 70%). On la retrouve particulièrement dans la population caucasienne [66].
- Dans le cadre des mutations de classe III et IV, la protéine CFTR est normalement traduite et adressée à la membrane apicale, mais elle n'est pas fonctionnelle. Dans le cas des mutations de classe III, on observe un défaut de régulation de CFTR dû à une diminution de la phosphorylation du domaine R. Pour les mutations de classe IV on observe une altération de la conduction du canal qui peut se traduire par des modifications de la sélectivité ou une diminution du flux ionique.

- Les mutations de classe V résultent d'une altération de la stabilité de l'ARN messager conduisant à la diminution du nombre de copies de CFTR et donc du nombre de protéines CFTR adressées à la membrane apicale.
- Les mutations de classe VI sont à l'origine de l'altération de la stabilité de la protéine CFTR mature au niveau de la membrane apicale.

3.2.4 Approches thérapeutiques fondamentales

Depuis la découverte de CFTR, de nombreux progrès en termes de soins médicaux ont été réalisés. Bien que l'espérance de vie soit d'environ une cinquantaine d'années en moyenne pour les patients, la mucoviscidose reste une maladie incurable. Il existe deux approches thérapeutiques fondamentales. La première consiste en des traitements multiples destinés à soulager les symptômes de la maladie en ciblant les problèmes pulmonaires (infection, mucus). Cependant, ces traitements n'ont qu'une approche symptomatique. La seconde consiste à cibler les causes premières de la maladie, c'est-à-dire à refaire fonctionner la protéine CFTR défectueuse en la remplaçant par thérapie génique ou à l'aide de moyens pharmacologiques. Comme décrit précédemment, le dysfonctionnement de la protéine CFTR serait à l'origine de la maladie, il semble donc logique de penser qu'une correction de son activité soit la clé de la guérison pour les patients. En effet, la restauration de la sécrétion chlorure est l'enjeu majeur du développement de thérapeutiques pharmacologiques de la mucoviscidose [67]. À ce jour, il est possible d'agir grâce à des composants pharmacologiques sur CFTR en ciblant son système de régulation ou directement sur le canal par l'intermédiaire d'activateurs ou de potentiateurs directs ou indirects [68–70] (Figure 3.6).

Classes of compounds		Target	Mechanism of action	Pharmacological compounds
Monotherapies	PTC read-through	Class I (nonsense mutations)	Generate a full-length CFTR by complete translation of CFTR transcript	Ataluren Escin NB30, NB54, NB124
	mRNA repair therapy	All classes	Repair the CFTR mRNA to generate a WT-CFTR transcript	QR-010 (specific for F508del-CFTR)
	Correctors	Class II	Rescue F508del-CFTR to the plasma membrane	Lumacaftor, tezacaftor, VX-152, VX-440 Sildenafil, riociguat FDL-169 PTI-C1811
	Potentiators	Class III Class IV	Bind to CFTR to increase open probability	Ivacaftor CTP-656 QBW251 GLPG1837/ABBV-974 FDL-176
Combitherapies	Corrector/potentiator	Class II/III	Rescue F508del-CFTR to the plasma membrane, increase CFTR open probability	Lumacaftor/ivacaftor Tezacaftor/ivacaftor Lumacaftor/QBW251
	Corrector 1/corrector 2/potentiator	Class II/III	Rescue F508del-CFTR to the plasma membrane via two distinct mechanisms and increase CFTR open probability	Tezacaftor/VX-152/ivacaftor Tezacaftor/VX-440/ivacaftor
	Corrector/stabilizer	Class II	Rescue F508del-CFTR to the plasma membrane and enhance rescued F508del-CFTR stability	Cysteamine/EGCG
	Corrector/potentiator/stabilizer	Class II/III/VI	Rescue F508del-CFTR to the plasma membrane, increase CFTR open probability, and enhance rescued F508del-CFTR stability	Lumacaftor/ivacaftor/N91115
	Potentiator/stabilizer	Class VI	Increase CFTR open probability and enhance rescued F508del-CFTR stability	Ivacaftor/N91115
	Amplifier/other modulator(s)	All classes	Increase the amount of immature CFTR to provide more substrate for other modulators to act upon	PTI-428/other(s)

Figure 3.6: Mécanismes d'action et cibles des modulateurs pharmacologiques de CFTR disponibles pour les patients atteints de mucoviscidose ou en développement pré-clinique (d'après [71])

3.3 Données cliniques

Globalement, la fonction de CFTR est de réguler le transport des ions et les mouvements d'eau au travers de la barrière épithéliale des cellules qui produisent du mucus, de la sueur ou de la salive. Sans altération, CFTR assure la sécrétion passive des ions Cl⁻ à travers la membrane apicale. Ce mouvement anionique est important dans le contrôle des mouvements d'eau dans les tissus épithéliaux, élément nécessaire pour la production d'un fin mucus qui va protéger les voies aériennes, le système digestif et reproducteur, ainsi que d'autres organes et tissus.

Dans la mucoviscidose, **les atteintes pulmonaires** sont les plus graves car elles se révèlent fatales dans la plupart des cas. Succinctement, le gène CFTR défectueux est à l'origine d'une absorption de l'eau contenue dans le mucus qui protège les voies respiratoires. Cette couche fine devenue visqueuse empêche les cellules ciliaires de battre et donc les mécanismes d'évacuation du mucus de fonctionner correctement. Ainsi, les particules inhalées restent retenues à la surface des voies aériennes et des

bactéries trouvent un environnement favorable à leur prolifération. **Les atteintes pancréatiques**, elles, ont pour conséquence une difficulté d'assimilation des nutriments, puisque le pancréas, très abîmé de naissance et encombré par un épaissement du mucus, empêche la bonne libération des enzymes essentielles à une bonne digestion. **Le foie et le système digestif**, également atteints, peuvent présenter une cirrhose biliaire pour le premier et une constipation et obstruction intestinale pour le second. **Un retard de la puberté** et une **infertilité** peuvent aussi toucher certains patients (Figure 3.7).

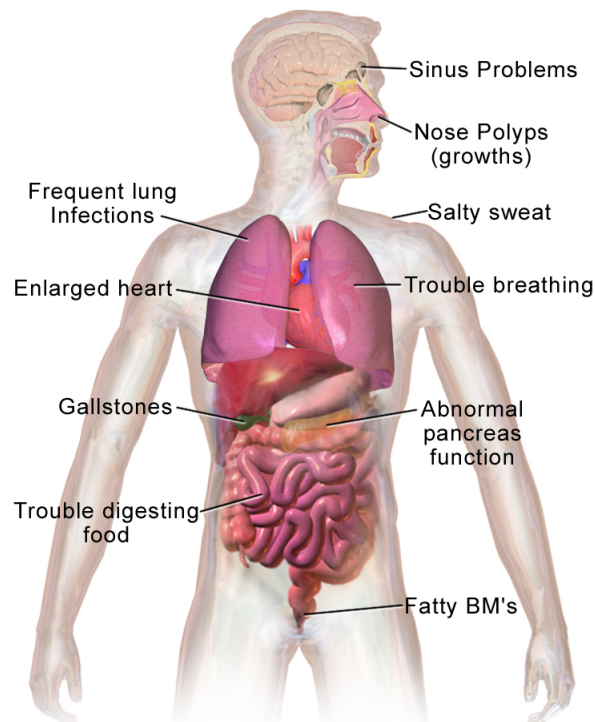


Figure 3.7: Organes atteints et problèmes de santé associés à la mucoviscidose (d'après [72])

On peut observer une large diversité d'expression clinique d'un patient à l'autre, que ce soit pour l'âge d'apparition des premiers symptômes ou la sévérité de l'évolution de la maladie, mais un déclin des fonctions pulmonaires caractérisé par une infection progressive des voies respiratoires ainsi qu'une inflammation reste la cause principale de la morbidité et de la mortalité associées à la mucoviscidose.

L'inflammation

4.1 Généralités

La réaction inflammatoire ou inflammation est définie comme la réponse locale à toutes sortes d'agressions des tissus vascularisés et vivants. Habituellement bénéfique pour l'organisme, ce processus a pour but de réparer les lésions et d'éliminer l'agent pathogène, mais peut conduire dans certains cas à une inflammation néfaste pour l'organisme en raison de l'agressivité ou de la persistance de cet agent. D'autres causes, comme des anomalies dans la régulation du processus inflammatoire ou lorsque la quantité ou la qualité des éléments intervenant dans l'inflammation sont altérées, peuvent aussi conduire à une inflammation néfaste. C'est le cas de la mucoviscidose, maladie caractérisée par des atteintes pulmonaires progressives graves qui sont la cause principale de morbidité et de mortalité chez les patients. Il existe de multiples causes à l'origine de l'inflammation, comme les agressions de type physique (traumatisme, chaleur/froid, radiations) ou chimique (agents caustiques, toxines, venins), l'infection par des micro-organismes comme les bactéries, virus, parasites et champignons ou une agression dys-immunitaire (anomalie de la réponse immunitaire, allergies. . .) qui sont capable de déclencher une inflammation.

Dans tous les cas, l'agent pathogène peut être soit endogène soit exogène. Plusieurs causes peuvent être responsables du déclenchement de l'inflammation et, pour un même agent pathogène, on assiste à des réactions inflammatoires différentes selon l'hôte et l'état de ses défenses immunitaires. Les acteurs de l'inflammation qui l'entretiennent ou la modifient sont divers et variés. Parmi ces acteurs, il y a les médiateurs pro et anti-inflammatoires. Même si les réactions inflammatoires peuvent être différentes d'un patient à l'autre, l'inflammation présente des mécanismes communs dont les étapes varient en fonction de l'organe et de l'agent pathogène responsables. La réaction inflammatoire comporte plusieurs étapes successives.

4.2 Les cellules de l'inflammation

Appartenant au système immunitaire certaines de ces cellules sont particulièrement agressives et tuent (par phagocytose) tous les éléments reconnus comme étrangers et les virus afin de les éliminer. Les cellules résidentes des tissus comprennent les phagocytes mononuclés résidents (cellules dendritiques et macrophages) ainsi que les mastocytes [73]. Si cette première ligne de défense est franchie, l'organisme réagit en organisant une contre-attaque cellulaire capable de tuer l'élément étranger. Ce moyen de défense entre en action très rapidement après le début de l'infection. Les cellules sont activées par le contact avec les éléments étrangers. En réponse, elles libèrent des médiateurs de l'inflammation notamment des cytokines pro-inflammatoires et de l'histamine, un vasodilatateur qui va favoriser le recrutement des cellules qui circulent *via* le sang dans l'ensemble de l'organisme tels que les lymphocytes T et B, les cellules NK (*Natural Killer*), les monocytes qui se différencient en macrophages en gagnant le tissu où ils seront qualifiés de résidents [73].

Les granulocytes sont les leucocytes les plus nombreux dans la circulation périphérique. La famille des granulocytes regroupe les polynucléaires basophiles, éosinophiles et neutrophiles. Entre les divers types de granulocytes d'importantes différences fonctionnelles existent. Ces cellules ont en commun un noyau multilobé, la présence dans leur cytoplasme de nombreuses granules et le fait que leur activité biologique s'exerce au niveau des tissus [74] (Figure 4.1). Les fonctions des neutrophiles sont la défense de l'hôte, la phagocytose et la destruction de pathogènes invasifs [75]. En réponse à une infection, les neutrophiles génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) *via* la NADPH oxydase et secrètent pour protéger l'organisme des protéines granulaires anti-microbiennes comprenant entre autres l'élastase, la collagénase, les cathepsines et la myéloperoxydase. De l'ADN peut être libéré par les neutrophiles pour former des NETS (*neutrophil extracellular traps*) qui vont pièger les bactéries afin de les éliminer [76, 77]. Si cette réponse n'est pas contrôlée, des lésions tissulaires excessives et graves peuvent en résulter. Ces lésions représentent la majorité des atteintes pulmonaires observées chez les patients atteints de mucoviscidose.

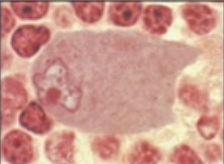
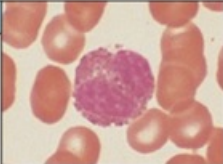

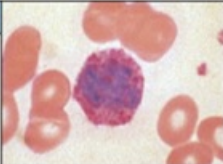
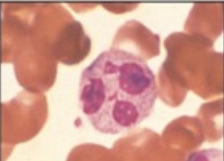
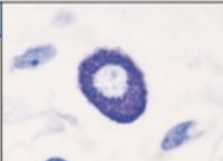
Cell		Activated function	Cell		Activated function
Macrophage		Phagocytosis and activation of bactericidal mechanisms Antigen presentation	Eosinophil		Killing of antibody-coated parasites
Dendritic cell		Antigen uptake in peripheral sites Antigen presentation in lymph nodes	Basophil		Unknown
Neutrophil		Phagocytosis and activation of bactericidal mechanisms	Mast cell		Release of granules containing histamine and other active agents

Figure 4.1: Fonctions de différents types de cellules immunitaires (d'après [78])

4.3 Étapes de l'inflammation

Les cellules de tous les tissus sont capables de produire des neuromédiateurs et notamment la substance P [79], un neuropeptide de 11 acides aminés qui peut favoriser la libération par les mastocytes de divers médiateurs (dégranulation), tels que, entre autres, des protéases (cathepsines...) [80], des cytokines (*Tumor Necrosis Factor* (TNF), Interleukine (IL)-6...) et des médiateurs de la vasodilatation comme les prostaglandines (PG) et l'histamine [81–83]. Parallèlement, un phénomène d'accolement à la paroi des vaisseaux sanguins (margination) des leucocytes (cellules NK (*Natural Killer*), monocytes et lymphocytes) a lieu grâce à l'expression d'adhésines. La production de deux peptides du système complément C3a et C5a entraîne aussi une dégranulation et une activation des mastocytes [84]. Après activation, les mastocytes produisent des cytokines qui, en dehors de leurs effets locaux, peuvent rejoindre la circulation sanguine et exercer leurs effets à distance [85]. Les leucocytes, suite à leur margination, migrent dans les espaces extravasculaires, attirés par divers facteurs chimiotactiques et le $TGF\beta$ (*Transforming Growth Factor \beta*) : c'est la diapédèse. Ce processus permet aux monocytes d'achever leurs différenciations en macrophages [86]. Ces cellules, comme les polynucléaires neutrophiles produisent, particulièrement lors de la phagocytose, des radicaux libres dont les effets cytotoxiques locaux sont importants. Les macrophages ainsi que les polynucléaires neutrophiles produisent aussi de nombreuses hydrolases qui, entre autres, dégradent les constituants de la matrice extracellulaire (collagène, élastine...) [87] (Figure 4.2).

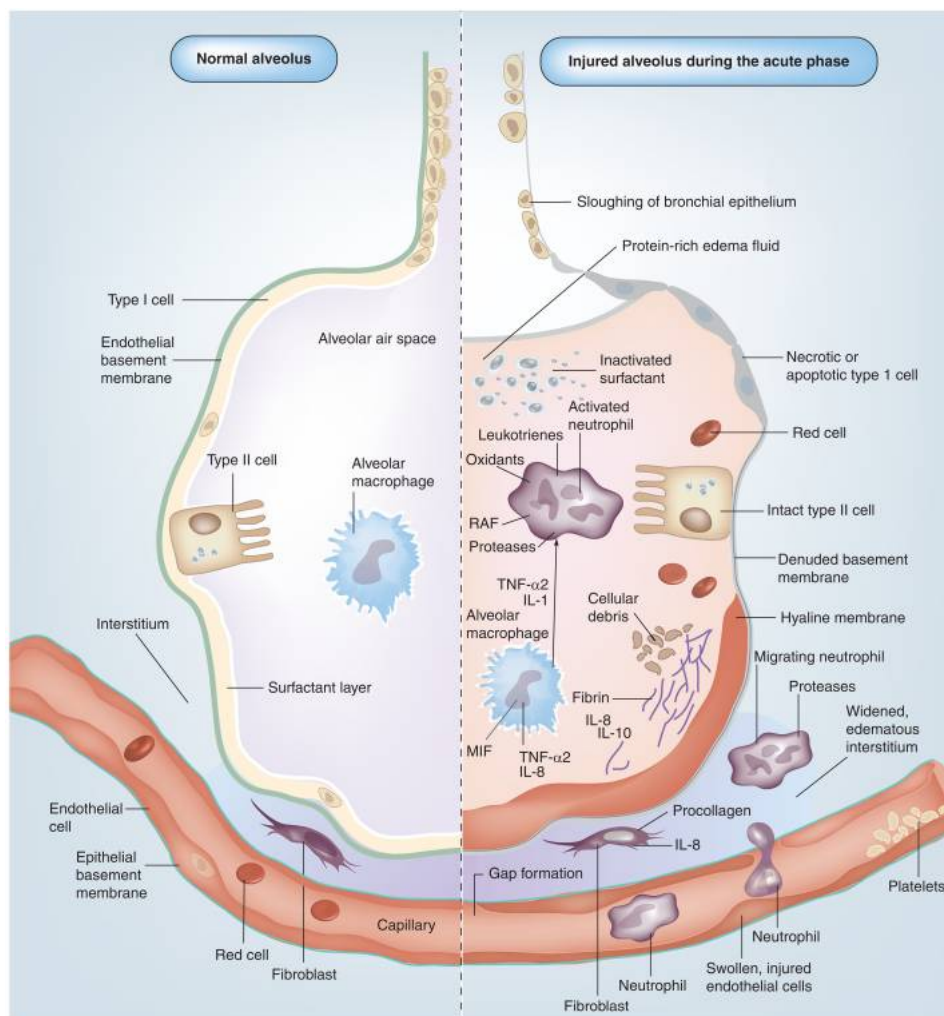


Figure 4.2: Schéma des différentes étapes de l'inflammation alvéolaire (d'après [88])

Lorsque les inducteurs de la réaction inflammatoire ont disparu et que les produits résultant de la dégradation des tissus ont été éliminés, la cicatrisation peut avoir lieu. Celle-ci est caractérisée par une prolifération des fibroblastes, la synthèse du collagène et des protéoglycanes [89].

Parmi les médiateurs clés impliqués dans l'inflammation on trouve les cytokines. Ce sont des messagers chimiques de la communication intercellulaire qui jouent de multiples rôles importants dans les processus inflammatoires.

4.3.1 Les cytokines

Les cytokines constituent une famille d'une trentaine de membres regroupés en trois domaines d'activité : les cytokines de l'hématopoïèse, les cytokines de la réponse

immunitaire et les cytokines de l'inflammation. Cependant, les cytokines peuvent avoir des activités multiples qui les font appartenir en même temps à plusieurs domaines.

i Cytokines de l'hématopoïèse

Elles sont responsables de la prolifération et de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Elles contrôlent la production de chacune des variétés des cellules sanguines (globules rouges, monocytes, lymphocytes, plaquettes. . .). Parmi ces cytokines, il y a les *colony stimulating factors* (G-CSF, GM-CSF) [90].

ii Cytokines de la réponse immunitaire

Le développement de la réponse immunitaire est très directement sous la dépendance de plusieurs cytokines. Il y a deux principales familles de cytokines immunitaires [91, 92] :

- les cytokines dites de « type 1 », dont l'un des premiers membres identifiés est l'IL-2 produite principalement par les lymphocytes Th1 (*T helper 1*). L'IL-2 est la seule cytokine dont l'action est exclusivement lymphocytaire. Ceci est dû au fait que seuls les lymphocytes expriment son récepteur [93]. L'IL-15 possède des homologies structurelles et fonctionnelles avec l'IL-2. Cependant, l'IL-15 est essentiellement produite par les monocytes/macrophages [94]. Les interférons (IFN) sont importants pour la communication intercellulaire et sont considérés comme de véritables cytokines [95]. L'IL-12 est produite par les monocytes/macrophages activés. Son rôle est une activité synergique avec l'IL-2 pour induire la sécrétion de l'IFN γ par les lymphocytes NK. L'IL-2, l'IFN γ et l'IL-12 induisent la sécrétion d'autres cytokines, dites pro-inflammatoires [96] ;
- les cytokines dites de « type 2 », parmi lesquelles l'IL-4 produite par les lymphocytes Th2, les leucocytes basophiles et les mastocytes. Elle possède un large spectre d'activités biologiques et est essentielle à la production d'immunoglobuline de type E. Elle inhibe la synthèse des cytokines de l'inflammation (IL-1, TNF, IL-6 et cytokines chimiotactiques) et stimule leurs inhibiteurs physiologiques [97, 98].

C'est une cytokine qui a donc des effets anti-inflammatoires. L'IL-13 partage de nombreuses activités avec l'IL-4, dont la synthèse de l'immunoglobuline E

et l'effet anti-inflammatoire [97]. L'IL-10 figure parmi les cytokines Th2 et présente des effets anti-inflammatoires puissants en agissant sur la production des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages comme l'IL-1, TNF et IL-6 [99]. L'IL-10 est aussi capable d'inhiber la production d'IL-1 et des TNF en agissant sur leurs inhibiteurs respectifs [100].

iii Cytokines de l'inflammation

L'activation macrophagique comporte toute une série d'événements cellulaires comme la synthèse de radicaux libres et de monoxyde d'azote et la synthèse de toute une série de protéines parmi lesquelles les protéases et bien sûr les cytokines. Les deux cytokines les plus produites par les macrophages sont l'IL-1 et le TNF. Beaucoup d'autres cytokines sont produites par les macrophages comme l'IL-6 et les chimiokines (cytokine à activité chimiotactique) [99]. Les chimiokines sont des petites cytokines divisées en deux sous-groupes d'une dizaine de membres chacun : les sous-groupes CXC et CC. Celles appartenant au sous-groupe CXC, dont le prototype est l'IL-8, sont chimiotactiques pour les polynucléaires et non pour les macrophages [101].

Les chimiokines du sous-groupe CC, dont le prototype est le MCP-1 (*Monocyte Chemoattractic Protein 1* ou CCL2), sont à l'inverse chimiotactiques pour les monocytes et les macrophages et non pour les polynucléaires [102]. La sécrétion de ces deux types de chimiokines par les cellules endothéliales attire les polynucléaires et les macrophages sur le site de l'inflammation. L'IL-6 est une cytokine extrêmement importante au cours de l'inflammation, elle est sécrétée par les macrophages et surtout par les cellules vasculaires à proximité du site de l'inflammation. Elle stimule la synthèse hépatique de protéines [103, 104] (Figure 4.3).

	Cytokine	Main sources	Target cell	Major function
Interleukins	IL-1	Macrophages, B cells, DCs	B cells, NK cells, T-cells	Pyrogenic, pro-inflammatory, proliferation and differentiation, BM cell proliferation
	IL-2	T cells	Activated T and B cells, NK cells	Proliferation and activation
	IL-3	T cells, NK cells	Stem cells	Hematopoietic precursor proliferation and differentiation
	IL-4	Th cells	B cells, T cells, macrophages	Proliferation of B and cytotoxic T cells, enhances MHC class II expression, stimulates IgG and IgE production
	IL-5	Th cells	Eosinophils, B-cells	Proliferation and maturation, stimulates IgA and IgM production
	IL-6	Th cells, macrophages, fibroblasts	Activated B-cells, plasma cells	Differentiation into plasma cells, IgG production
	IL-7	BM stromal cells, epithelial cells	Stem cells	B and T cell growth factor
	IL-8	Macrophages	Neutrophils	Chemotaxis, pro-inflammatory
	IL-9	T cell	T cell	Growth and proliferation
	IL-10	T cell	B cells, macrophages	Inhibits cytokine production and mononuclear cell function, anti-inflammatory
	IL-11	BM stromal cells	B cells	Differentiation, induces acute phase proteins
	IL-12	T cells	NK cells	Activates NK cells
Tumour necrosis factors	TNF-α	Macrophages	Macrophages	Phagocyte cell activation, endotoxic shock
	TNF-β	Monocytes T-cells	Tumour cells Phagocytes, tumour cells	Tumour cytotoxicity, cachexia Chemotactic, phagocytosis, oncostatic, induces other cytokines
Interferons	IFN-α	Leukocytes	Various	Anti-viral
	IFN-β	Fibroblasts	Various	Anti-viral, anti-proliferative
	IFN-γ	T-cells	Various	Anti-viral, macrophage activation, increases neutrophil and monocyte function, MHC-I and -II expression on cells
Colony stimulating factors	G-CSF	Fibroblasts, endothelium	Stem cells in BM	Granulocyte production
	GM-CSF	T cells, macrophages, fibroblasts	Stem cells	Granulocyte, monocyte, eosinophil production
	M-CSF	Fibroblast, endothelium	Stem cells	Monocyte production and activation
	Erythropoietin	Endothelium	Stem cells	Red blood cell production
Others	TGF-β	T cells and B cells	Activated T and B cells	Inhibit T and B cell proliferation, inhibit haematopoiesis, promote wound healing

Abbreviations: BM, bone marrow; DCs, dendritic cells; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factors; M-CSF, macrophage colony stimulating factor; Th, T helper cells.

Figure 4.3: Liste des cytokines, de leurs fonctions, de leurs cibles et de leurs sites de sécrétion (d'après [105])

4.4 Cas de la mucoviscidose

4.4.1 Présence du processus inflammatoire

Au cours des 30 dernières années, de nombreuses études ont permis de mettre en lumière les mécanismes moléculaires et cellulaires du processus inflammatoire associé à la mucoviscidose. Cependant, le lien entre l'infection et l'inflammation, d'un côté, et l'activité CFTR et l'inflammation, de l'autre côté, reste très énigmatique et controversé [106–110]. Une des caractéristiques physiopathologiques de la mucoviscidose est l'inflammation pulmonaire chronique dominée par l'influx de granulocytes, notamment des neutrophiles, au niveau des voies aériennes qui se traduit par la libération excessive d'élastases et d'autres protéinases induisant une dégradation progressive du tissu pulmonaire [111, 112]. Au niveau cellulaire, les réactions inflammatoires ont été caractérisées au niveau des macrophages, neutrophiles et de l'épithélium pulmonaire. Chaque type cellulaire remplit une fonction qui lui est propre, et, parmi ceux-ci, le polynucléaire neutrophile (PNN) joue un rôle très important. Acteur majeur de la

défense de l'hôte contre le pathogène, il contribue à sa destruction *via* la libération de médiateurs de l'inflammation et la production de ROS.

i Les neutrophiles

En hypoxique, condition caractéristique d'un mucus mucoviscidosique, la demi-vie des neutrophiles est augmentée. Cette longévité permet à ces cellules d'exercer leurs effets pro-inflammatoires au niveau pulmonaire de manière chronique [113]. De plus, il a été montré que CFTR est exprimé dans les neutrophiles. Cette expression est importante pour leur fonction de phagocytose et d'exocytose granulaire [114]. De plus, d'autres études ont montré que les neutrophiles mucoviscidosiques présentent des variations dans les concentrations cytoplasmiques de certains ions. Ainsi, il a été observé une augmentation des ions chlorures et sodium et une diminution des ions magnésium [115]. Ces changements de concentrations semblent être partiellement restaurés par Ivacaftor, un potentiateur de CFTR utilisé dans le traitement de la mucoviscidose associée à la mutation G551D [115]. Dans la mucoviscidose, les neutrophiles présentent aussi un défaut dans le contrôle de la réponse inflammatoire associé à une incapacité à phagocyter et à débarrasser les poumons des bactéries [111]. Plusieurs études ont aussi montré la présence d'une multitude de différences entre les neutrophiles issus de patients atteints de mucoviscidose et ceux d'individus sains. Particulièrement, il a été observé une augmentation de la production de ROS [116], de la dé-granulation [117], de l'activité protéolytique ainsi qu'une augmentation de la libération d'élastases [118, 119], de métalloprotéinases matricielle (MMP) [118, 120, 121] et de l'apoptose [122, 123]. De plus, on observe une diminution dans l'activité anti-microbienne [124] et une dérégulation dans la production de cytokines [125].

ii Les macrophages

Dans la mucoviscidose, plusieurs défauts fonctionnels ont été observés au niveau des macrophages [126]. Ils présentent une diminution de leur capacité de clairance des cellules apoptotiques [123, 127–129], de la production de cytokines [130–133] et une diminution de la capacité de phagocytose [132–137]. Les macrophages montrent aussi une dérégulation du mécanisme de leur recrutement et de leur fonction phagocytaire bien avant leur stimulation par l'infection [138].

iii Les cellules épithéliales

L'épithélium pulmonaire participe activement à l'immunité innée et orchestre les réponses inflammatoires. L'interaction des pathogènes avec l'épithélium des voies aériennes est une étape indispensable à l'activation des mécanismes de défense impliquant les neutrophiles et les macrophages. La stimulation de l'épithélium par les pathogènes se fait *via* l'activation des toll-like récepteurs (TRL) [139, 140] par différents ligands (lipopeptide, peptidoglycane, acide lipotéichoïque, fragment CXCR1) et l'activation des voies de transcription AP-1 et NF- κ B [141]. Ces processus de stimulation et d'activation entraînent la production de cytokines pro-inflammatoires responsables du recrutement des leucocytes et monocytes [142]. En temps normal, l'induction d'ARN messager de cytokine pro-inflammatoire, entre autres IL-8, GRO- α , MIP-3, diminue après une exposition chronique aux produits bactériens. Par contre la production de cytokine suite à une infection par *Pseudomonas Aeruginosa* ne baisse pas nécessairement chez les patients atteints de mucoviscidose, ce qui suggère une inflammation soutenue des voies aériennes [143].

4.4.2 L'inflammation précoce

La colonisation de l'arbre respiratoire par des agents bactériens tels que *Pseudomonas aeruginosa* a été initialement considérée comme l'élément déterminant dans l'initiation et le développement des processus inflammatoires [144]. Cependant, il semble que la cascade d'événements associée à la progression de la maladie implique tout d'abord le déclenchement d'une inflammation pulmonaire et, ensuite, l'apparition d'une infection des voies respiratoires qui serait ainsi la conséquence de l'inflammation initiale [111]. Chez les malades atteints de mucoviscidose, le poumon, anatomiquement normal à la naissance, présente dès les premières semaines et mois de vie les stigmates d'une atteinte inflammatoire [145]. Il a été aussi observé chez des enfants et fœtus atteints de mucoviscidose une quantité importante de neutrophiles au niveau des voies respiratoires qui augmente au fur et à mesure que la maladie progresse [146, 147].

L'analyse de liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA) de très jeunes enfants atteints de mucoviscidose a permis de mettre en évidence la présence de marqueurs d'inflammation, avec en particulier une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles, une activité élastasique accrue, un taux important d'IL-8 et une absence d'IL-10. Ces facteurs étaient présents alors même que les différentes investigations

microbiologiques ne retrouvaient pas d'agents bactériens, de virus respiratoires, ni d'agents mycosiques [148, 149]. Ce dernier point a fait évoquer la participation d'un mécanisme primaire lié à l'anomalie génétique elle-même, en partie responsable de l'état inflammatoire de la muqueuse. D'ailleurs, dans ce sens, on a montré que la mutation delF508 était capable d'induire directement l'inflammation en absence de toute infection [150]. La présence d'un déficit constitutif de la production d'IL-10 et l'expression accrue d'IL-8, à l'état basal, dans le liquide bronchique mucoviscidosique et dans le liquide sécrété par des cellules épithéliales mucoviscidosiques, suggèrent qu'il existe un déséquilibre constitutif et endogène de la balance pro-vs-anti-inflammatoire dans la mucoviscidose. Il apparaît, au vu des données récentes de la recherche, que l'absence de sécrétion des ions Cl⁻ contribue à l'activation du facteur de transcription NF- κ B associée à la dérégulation de la balance cytokinique par les cellules mucoviscidosiques [149]. La production d'IL-10 par les cellules bronchiques épithéliales est également diminuée chez les sujets atteints de mucoviscidose [130].

L'agression inflammatoire initiale observée au niveau pulmonaire chez les jeunes malades atteints de mucoviscidose suggère qu'au niveau cellulaire d'autres mécanismes que l'infection sont à l'origine de son installation. L'analyse de plusieurs données publiées, notamment celles qui traitent des cellules épithéliales pulmonaires, permet d'émettre l'hypothèse de la participation du stress oxydatif dans le processus inflammatoire précoce. [151–154]. Plusieurs anomalies ont été détectées en relation avec la réponse inflammatoire épithéliale, particulièrement la présence d'un stress oxydatif chronique. En effet, une diminution du transport du glutathion (GSH), un puissant antioxydant intracellulaire, dans la lumière des voies respiratoires a été associée à la diminution de la fonction CFTR [151, 152]. Aussi, il a été montré qu'un défaut de CFTR serait impliqué dans la variation de l'expression de certains gènes associés à la balance redox [153]. De plus, une diminution de l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) a été observée dans les cellules épithéliales mucoviscidosiques [149]. Finalement, une dérégulation de l'activité mitochondriale, premier site de production de ROS, a été reportée dans les cellules mucoviscidosiques [155]. Ces variations seraient à l'origine de l'augmentation du stress oxydatif dans les voies respiratoires de jeunes patients atteints de mucoviscidose [154].

De plus, un défaut dans l'activité bactéricide des cellules épithéliales pulmonaires a été associé au stress oxydatif [141]. L'ensemble de ces résultats tend à montrer qu'un défaut dans le contrôle de l'équilibre redox serait à l'origine du processus inflammatoire chronique observé chez les patients atteints de mucoviscidose.

Le stress oxydatif

Le stress oxydant est largement accepté comme étant une composante critique de plusieurs pathologies. En effet, il est, par exemple, lié au développement des maladies coronariennes, des accidents vasculaires cérébraux, du cancer et de la maladie d'Alzheimer [156–159]. Le stress oxydant se définit par une situation de déséquilibre entre la production des espèces réactives oxygénées (ROS) et azotées (RNS) appelées radicaux libres, et les mécanismes de défense et de détoxification de ces dernières. Durant ma thèse, j'ai mesuré et évalué uniquement les effets des ROS. C'est pourquoi, pour la suite, je ne vais introduire que les radicaux oxygénés.

5.1 Production et fonctions des radicaux libres oxygénés (ROS)

5.1.1 Production des ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Les ROS sont des espèces chimiques réactives contenant de l'oxygène radicalaire comme le radical superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($OH\bullet$) et non radicalaire comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le tableau suivant présente les principaux ROS de ces deux catégories (Figure 5.1).

Radicals	Nonradicals
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide ($O_2^{\cdot-}$)	Hydrogen peroxide (H_2O_2)
Hydroxyl (OH^{\cdot})	Hypochlorous acid (HOCl)
Peroxy (RO_2^{\cdot})	Hypobromous acid (HOBr)
Alloxyl (RO^{\cdot})	Ozone (O_3)
Hydroperoxyl (HO_2^{\cdot})	Singlet oxygen (1O_2)
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide (NO^{\cdot})	Nitrous acid (HNO_2)
Nitrogen dioxide (NO_2^{\cdot})	Nitrosyl cation (NO^+)
	Nitroxyl anion (NO^-)
	Peroxynitrite ($ONOO^-$)
	Peroxynitrous acid (ONOOH)
	Alkyl peroxynitrite (ROONO)

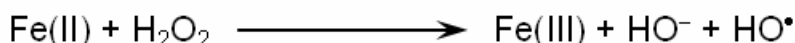
Figure 5.1: Les principales espèces réactives de l'oxygène (d'après [160])

Il existe deux grandes voies de production des ROS :

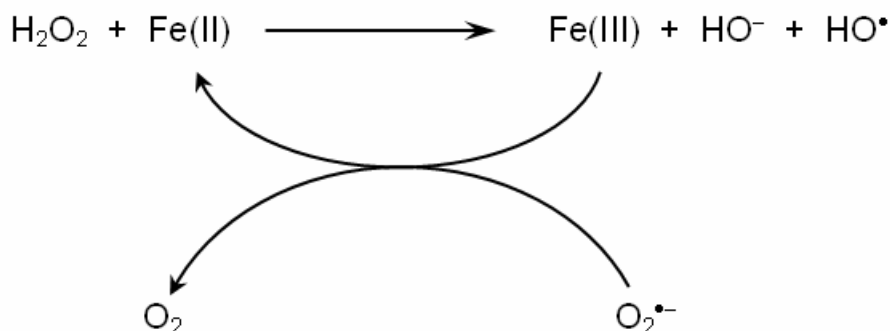
- **le transfert d'électrons lié au métabolisme cellulaire** : dans cette voie, les ROS sont les produits secondaires du métabolisme, comme lors de la respiration cellulaire par la mitochondrie ou le catabolisme des bases puriques par la xanthine oxydase. Les ROS peuvent aussi être produits par des enzymes spécifiques, comme la NO (*Nitric Oxide*) synthase ou le complexe NADPH oxydase (NOX), qui est un des gros producteurs de ROS endogène et dont il existe sept isoformes distinctes. Par exemple, la Nox-2 des phagocytes a un rôle majeur dans l'inflammation et dans l'immunité innée, et elle produit des ROS afin de se défendre contre les microorganismes ;
- **la scission homolytique des liaisons covalentes qui nécessite de l'énergie** : dans ce cas, la production de ROS résulte d'éléments exogènes comme une exposition à des radiations ou à la lumière du soleil.

En plus de ces deux voies, les métaux tels que le fer, le cuivre, le chrome, le vanadium et le cobalt sont aussi capables de réaliser un cycle redox dans lequel un seul électron peut être accepté ou cédé par le métal. Cette action catalyse la production de radicaux et d'espèces réactives de l'oxygène. La présence de ces métaux sous une forme non complexée peut augmenter considérablement le niveau de stress oxydatif. On pense que ces métaux induisent des réactions de Fenton et la réaction de Haber-Weiss, dans laquelle le radical hydroxyle est généré à partir du peroxyde d'hydrogène (Figure 5.2).

Fenton Reaction



Haber–Weiss Reaction (Superoxide Driven Fenton Reaction)



Haber–Weiss Net Reaction

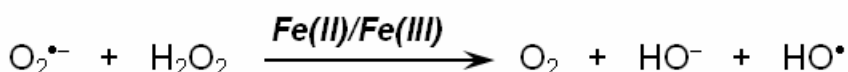


Figure 5.2: Mécanismes de production des radicaux libres par la réaction de Fenton et de Haber-Weiss (d'après [161])

5.1.2 Fonctions des ROS

La production de ROS est un processus physiologique nécessaire dans de nombreuses fonctions cellulaires. Plusieurs voies de signalisations, (MAPK, JNK...) sont régulées par les ROS [162, 163]. Une signalisation efficace et normale nécessite un court déséquilibre de la balance redox. Pourtant, un stress oxydatif peut survenir lorsqu'une augmentation de la production de ROS n'est pas finement régulée par les antioxydants et que celle-ci devient chronique. Le stress oxydatif induit par les ROS a été longtemps considéré comme étant à l'origine de dommages associés à plusieurs pathologies humaines. Néanmoins lorsqu'ils sont produits en quantité modérée et contrôlée, les ROS interviennent dans la signalisation intracellulaire qui régule la vie de la cellule (croissance, prolifération, différenciation), permettant ainsi aux cellules de s'adapter en mettant en place des réponses antioxydantes associées à un effet mémoire. Ce processus permet ultérieurement à la cellule, ultérieurement, de faire face à un stress oxydatif de niveau supérieur. Afin de minimiser l'impact des fluctuations de la production des ROS et de se protéger contre leurs effets néfastes, la cellule dispose de plusieurs moyens de lutte dits «antioxydants» [152].

5.2 Protection contre les ROS

La cellule a mis en places plusieurs systèmes pour se protéger des effets néfastes des ROS. Ces systèmes sont classés en deux catégories :

- le système de défense enzymatique qui inclut des enzymes antioxydantes clés comme la catalase, la SOD et la glutathion peroxydase (GPx). Il existe aussi des protéines antioxydantes comme les thiorédoxines et les peroxirédoxines. On trouve aussi des enzymes de la phase 2 de protection contre le stress oxydatif comme la glutathion S transférase, la thiorédoxine réductase, l'hème oxygénase-1 [164].
- le système de défense non enzymatique qui s'appuie sur des protéines (céruloplasmine, albumine. . .), des hydrosolubles (vitamine C, glutathion. . .), des liposolubles (α -tocophérol, γ -tocophérol, coenzyme Q10, caroténoïdes), et les polyphénols-flavonoïdes[164] (Figure 5.3).

Enzymatic antioxidants	Enzyme code	Reaction catalyzed	Subcellular location
Superoxide dismutase (SOD)	1.15.1.1	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$	Peroxisomes, Mitochondria, Cytosol, and Chloroplast
Catalase (CAT)	1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Peroxisome and Mitochondria
Ascorbate peroxidase (APX)	1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$	Peroxisomes, Mitochondria, Cytosol, and Chloroplast
Monodehydroascorbate reductase (MDHAR)	1.6.5.4	$2MDHA + NADH \rightarrow 2AA + NAD$	Mitochondria, Cytoplasm, and Chloroplast
Dehydroascorbate reductase (DHAR)	1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$	Mitochondria, Cytoplasm, and Chloroplast
Glutathione reductase (GR)	1.6.4.2	$GSSG + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP^+$	Mitochondria, Cytoplasm, and Chloroplast
Guaicol peroxidase (GPX)	1.11.1.7	$H_2O_2 + DHA \rightarrow 2H_2O + GSSG$	Mitochondria, Cytoplasm, Chloroplast, and ER
Non-enzymatic Antioxidants		Function	Subcellular location
Ascorbic Acid (AA)		Detoxifies H_2O_2 via action of APX	Cytosol, Chloroplast, Mitochondria, Peroxisome, Vacuole, and Apoplast
Reduced Glutathione (GSH)		Acts as a detoxifying co-substrate for enzymes like peroxidases, GR and GST	Cytosol, Chloroplast, Mitochondria, Peroxisome, Vacuole, and Apoplast
α -Tocopherol		Guards against and detoxifies products of membrane LPO	Mostly in membranes
Carotenoids		Quenches excess energy from the photosystems, LHCS	Chloroplasts and other non-green plastids
Flavonoids		Direct scavengers of H_2O_2 and 1O_2 and OH^\bullet	Vacuole
Proline		Efficient scavenger of OH^\bullet and 1O_2 and prevent damages due to LPO	Mitochondria, Cytosol, and Chloroplast

Figure 5.3: Liste des principaux antioxydants (d'après [165])

Dans les conditions physiologiques normales, la balance oxydants/antioxydants est équilibrée. Lorsqu'elle penche en faveur d'une surproduction non contrôlée de ROS, cela peut entraîner des dommages oxydatifs. Les ROS sont capables, *via* la réaction d'oxydation, de causer des dommages irréversibles à de nombreuses cibles moléculaires notamment les lipides, les protéines mais aussi l'ADN [166–168]. Ainsi, le potentiel antioxydant peut être apprécié par la détermination des activités enzymatiques des SOD, de la glutathion peroxydase (GPx) et des catalases et par l'évaluation

de la concentration des éléments non protéiques comme le GSH et les micronutriments antioxydants (vitamines, Sélénium, etc.). Aujourd'hui, il est bien documenté qu'un excès de ROS non contrôlé peut être à l'origine de plusieurs pathologies humaines comme la SLA [169]. Ainsi, les ROS sont capables de favoriser la transcription de gènes pro-inflammatoires pouvant participer au développement et à l'installation de pathologies aiguës ou chroniques [170, 171]. Au niveau pulmonaire, les cellules épithéliales qui tapissent l'appareil respiratoire sont, avec les macrophages, les premières cellules à réagir aux agressions. Les épithéliums bronchique et alvéolaire jouent un rôle de barrière dynamique en luttant contre le processus inflammatoire induit par le stress oxydant. Il en résulte des changements fonctionnels sur les tissus environnants induits *via* un effet paracrine des sécrétions épithéliales (cytokines et facteurs de croissance). Une exacerbation et/ou un dérèglement de fonctions épithéliales associés à une exposition répétée au stress oxydant peuvent être à l'origine d'une inflammation chronique [172–174].

Lorsque l'agression est trop importante, la sévérité des lésions cellulaires ne permet pas la mise en place des mécanismes d'adaptation et s'engage alors un processus de mort cellulaire par apoptose voire par nécrose [175]. C'est le cas dans la mucoviscidose pour laquelle de nombreuses études ont montré l'implication du stress oxydatif à différents niveaux aussi bien plasmatique qu'intracellulaire, mais aussi dans la lumière des poumons (études et analyses des LBA) [176–178].

5.3 Stress oxydant et mucoviscidose

Cet état de stress oxydatif dans le cas de la mucoviscidose a été évalué à différents niveaux [179–184].

5.3.1 Au niveau urinaire

Marqueur de l'oxydation des acides nucléiques, le 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), un désoxynucléotide libéré lors de la réparation des dommages oxydatifs à l'ADN, a été trouvé à de très fortes concentrations dans l'urine de patients atteints de mucoviscidose, ce qui suggère que de très nombreux dommages à l'ADN sont dus à l'oxydation chez ces patients [166]. On observe aussi une augmentation dans la peroxydation des lipides dans leurs urines [185].

5.3.2 Compartiment intracellulaire

i Au niveau cytoplasmique

Dans la cellule, la balance redox est principalement régulée par le niveau de glutathion. Le glutathion existe sous forme réduite (GSH) et sous forme oxydée (GSSG). Le GSH est présent en forte concentration dans les fluides extracellulaires, dans les poumons et dans les cellules. La GSH extracellulaire neutralise les radicaux libres produits par les neutrophiles lors de la réponse inflammatoire. Sachant que la protéine CFTR assure aussi le transport de GSH entre les cellules et le milieu extracellulaire, il est raisonnable de penser que le contenu en GSH intracellulaire peut être altéré dans la mucoviscidose [151, 186, 187].

Trois types de SOD ont été décrits chez les mammifères. On trouve la forme cytoplasmique dont l'activité est dépendante du cuivre (Cu) et du zinc (Zn) (Cu/Zn-SOD, encore appelé SOD1), la forme mitochondriale dont l'activité est dépendante du manganèse (Mn) (Mn-SOD ou SOD2) et finalement la forme extracellulaire (ou SOD3) [188]. Ces enzymes sont impliquées dans la diminution du niveau d'anions superoxydes qui endommagent les cellules lorsqu'ils sont présents à une concentration excessive [189].

Des modifications de l'expression et/ou de l'activité des SOD ont été décrites dans plusieurs pathologies telles que la SLA pour la SOD1 [190, 191], les cardiomyopathies pour la SOD2 [192, 193] et les maladies pulmonaires pour la SOD3 [194, 195]. En effet, la SOD3 est fortement exprimée dans les poumons et est associée à une diminution du recrutement de neutrophiles, ce qui suggère un rôle important dans la régulation de l'inflammation pulmonaire [188, 196].

Bien qu'il n'y ait aucune preuve directe de l'implication de SOD3 chez les patients mucoviscidosiques, son haut niveau d'expression pulmonaire n'exclut pas qu'elle ait probablement un rôle important à jouer chez ces patients. En outre, les cytokines pro-inflammatoires augmentent l'expression de la SOD3 en culture et dans les modèles animaux qui présentent des lésions pulmonaires [197, 198].

ii Au niveau mitochondrial

Parmi les compartiments cellulaires les plus étudiés dans la mucoviscidose, on retrouve en première position la mitochondrie qui est la source la plus significative de production des ROS dans la cellule et qui, par conséquent, a fait l'objet de nombreuses études. Ceci a commencé dans les années 1980 lorsqu'une forte consommation mitochondriale en oxygène a été observée chez les patients atteints de mucoviscidose en comparaison à des sujets sains [179]. Plus tard, il a été montré que cette forte consommation d'oxygène diminuait après traitement par un inhibiteur spécifique de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase, la ouabaïne, suggérant que l'augmentation de consommation d'oxygène serait liée à une augmentation de l'activité de l'ATPase même si aucun défaut de cette activité n'a été observé chez les patients [181, 199].

Dans les cellules épithéliales pulmonaires mucoviscidosiques, il a aussi été observé une diminution de l'expression du gène MTND4 qui code pour la protéine ND4 (l'une des sept sous-unités (ND1 à ND7) du complexe mitochondrial I (mtCx-I) [200]) ainsi qu'une diminution du niveau de la SOD2 (MnSOD) et du GSH mitochondrial [183, 184, 201]. Pour la concentration mitochondriale du calcium, des études contradictoires indiquent que l'on a une augmentation [202, 203] ou une diminution [204] de cette concentration.

Globalement, ces résultats indiquent que les niveaux élevés de ROS mitochondriales et cellulaires sont associés à un état déficitaire en CFTR. Il a été rapporté que la consommation d'oxygène et les activités mitochondriales du complexe I et IV sont altérées dans les cellules mucoviscidosiques, alors que la production de ROS mitochondrial et la peroxydation des lipides membranaires augmentent. Un traitement par un correcteur de CFTR le VX-809, a partiellement corrigé ces observations (Figure 5.4) [155].

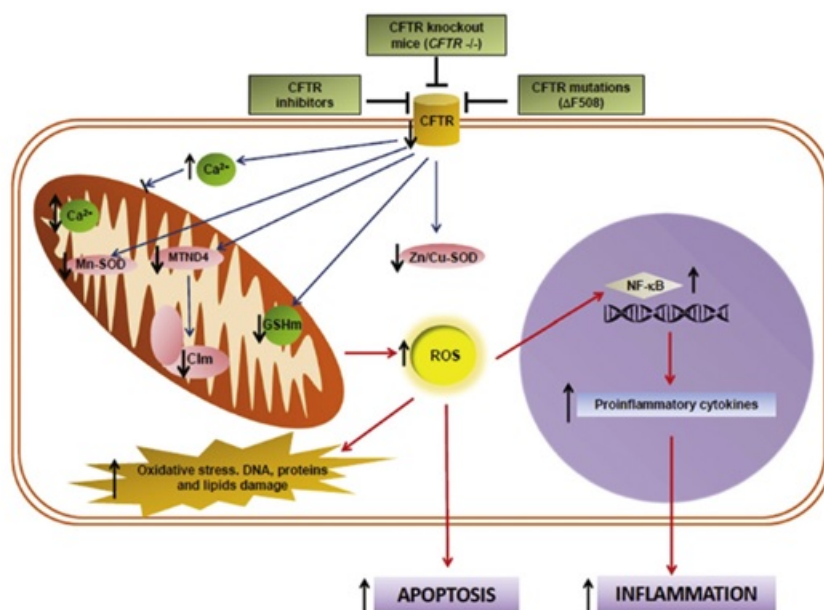


Figure 5.4: Schéma des altérations mitochondriales et leurs conséquences dans la mucoviscidose. (d'après [205])

Les effets des ROS sont doubles chez les patients mucoviscidosiques : d'une part, le stress cellulaire induit par les ROS inhibe la maturation de CFTR [206] ; d'autre part, une augmentation de ROS conduit à l'activation des voies de signalisation MAPK [162]. Cette cascade est connue pour réguler l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les cellules [207, 208]. Il est donc logique de penser que les ROS sont impliqués dans l'initiation et / ou le maintien de l'inflammation lors d'un déficit en CFTR. En outre, un excès de la production de cytokines pro-inflammatoires peut augmenter la production de ROS [209–211] perpétuant le cercle vicieux de l'inflammation chez les patients mucoviscidosiques.

Une diminution de la concentration du GSH mitochondriale a aussi été observée chez les souris déficientes en CFTR et dans les cellules épithéliales pulmonaires humaines mucoviscidosiques, tout comme un niveau élevé d'oxydation de l'ADN mitochondriale et une diminution de l'activité aconitase ce qui confirme l'existence d'un stress oxydatif de type mitochondrial chez les patients mucoviscidosiques [183]. Comme la GSH est connue pour inhiber la dégradation de $I\kappa B\alpha$, il est fort probable qu'une faible concentration cellulaire en GSH soit responsable de l'activation de $NF-\kappa B$ et participe ainsi au maintien de l'inflammation [212].

iii Au niveau du réticulum endoplasmique (RE)

L'accumulation de protéines mal repliées dans le RE (cas de la protéine CFTR porteuse de la mutation delF508) induit un stress qui nécessite une prise en charge par ce dernier. C'est le rôle de l'UPR (*Unfolded Protein Response*) qui se traduit par une triple action : une inhibition de la synthèse protéique afin de limiter la quantité de protéines mal formées dans la lumière du RE, une augmentation de la synthèse de chaperonnes qui aident au repliement des protéines et une augmentation de l'activité et de la synthèse des protéines du système de dégradation (ERAD ; *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*), ceci afin que le RE recouvre son homéostasie normale, ce qui permet d'éviter le déclenchement des mécanismes de l'apoptose. Chez l'homme, trois protéines transmembranaires du RE sont impliquées dans l'UPR ; PERK (*Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), IRE-1 (*Inositol Requiring Enzyme 1*) et ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*). Ce sont leurs interactions avec la chaperonne BiP/GRP78 qui les maintiennent inactives.

iii.1 PERK PERK est une protéine kinase transmembranaire membre de la famille des PEK située dans la membrane du RE. Un stress induit la dimérisation de son domaine N-terminal provoquant l'autophosphorylation de son domaine kinase C-terminal, augmentant ainsi son activité. Suite à cette activation, PERK est capable de fixer et de phosphoryler la sous-unité α du facteur 2 d'initiation de la traduction eIF2 (*Eukaryotic Initiation Factor 2*) requise dans l'initiation de la traduction. Cela induit son inactivation et donc un blocage rapide de la synthèse protéique globale, réduisant ainsi la quantité de protéines mal repliées dans le RE [213, 214].

iii.2 ATF6 ATF6 est un facteur de transcription membre de la famille des ATF atypiques car il est synthétisé sous forme d'une protéine transmembranaire intégrée dans le RE. ATF6 fonctionne comme un senseur de stress du RE. Après sa réduction, ATF6 est transporté dans l'appareil de Golgi où il est soumis à une protéolyse par les protéases S1-P et S2-P (Site-1 Protease et Site-2 Protease). Le domaine N-terminal est libéré, se dimérise et migre vers le noyau où il fonctionne comme un facteur de transcription nucléaire classique. À ce niveau, il va se fixer grâce à son domaine bZIP (*Basic Leucine Zipper*) sur les séquences appelées ERSE (*Endoplasmic Reticulum Stress response Element*) des promoteurs de gènes codants pour les chaperonnes du RE. Ces dernières aident les protéines nouvellement synthétisées à se replier correctement [215–217].

iii.3 IRE-1 IRE1 est une sérine/thréonine kinase qui possède une activité endoribonucléase (RNase). Elle possède un domaine kinase N-terminal situé dans la lumière du RE et un domaine ribonucléase C-terminal situé dans le RE. Il existe deux isoformes de IRE-1 : IRE-1 α et IRE-1 β qui sont codées par deux gènes différents localisés sur le chromosome 17 pour IRE-1 α et 16 pour IRE-1 β . Elle a été identifiée en 1990 chez *Saccharomyces cerevisiae* et il a été observé que son activité est liée à une baisse de concentration en inositol [218]. Depuis peu il a été montré que IRE-1, à l'aide de son domaine N-terminal, détecte et peut interagir directement dans la lumière du RE avec les protéines mal repliées. Lors d'un stress RE, IRE-1 s'homodimérise, ce qui va conduire à son autophosphorylation et au déclenchement de son activité RNase [219].

Suite à son activation, IRE-1 active de multiples voies de signalisations, telles que la voie JNK, et participe donc à la régulation des processus d'apoptose, soit par l'épissage alternatif du facteur de transcription Xbp-1 (*X-box binding protein 1*) qui possède un domaine bZIP de liaison aux ERSE, soit par des modifications post-transcriptionnelles de divers substrats. L'activation de la voie de signalisation IRE1/XBP induit l'expression des gènes codants pour des chaperonnes et des protéines de l'ERAD [220]. IRE-1 est aussi capable de dégrader les microARN anti-Casp2 afin d'initier la mort cellulaire, faisant de lui le régulateur de la balance entre l'apoptose et la protection cellulaire, et représente ainsi la protéine clé de la réponse UPR [220] (Figure 5.5).

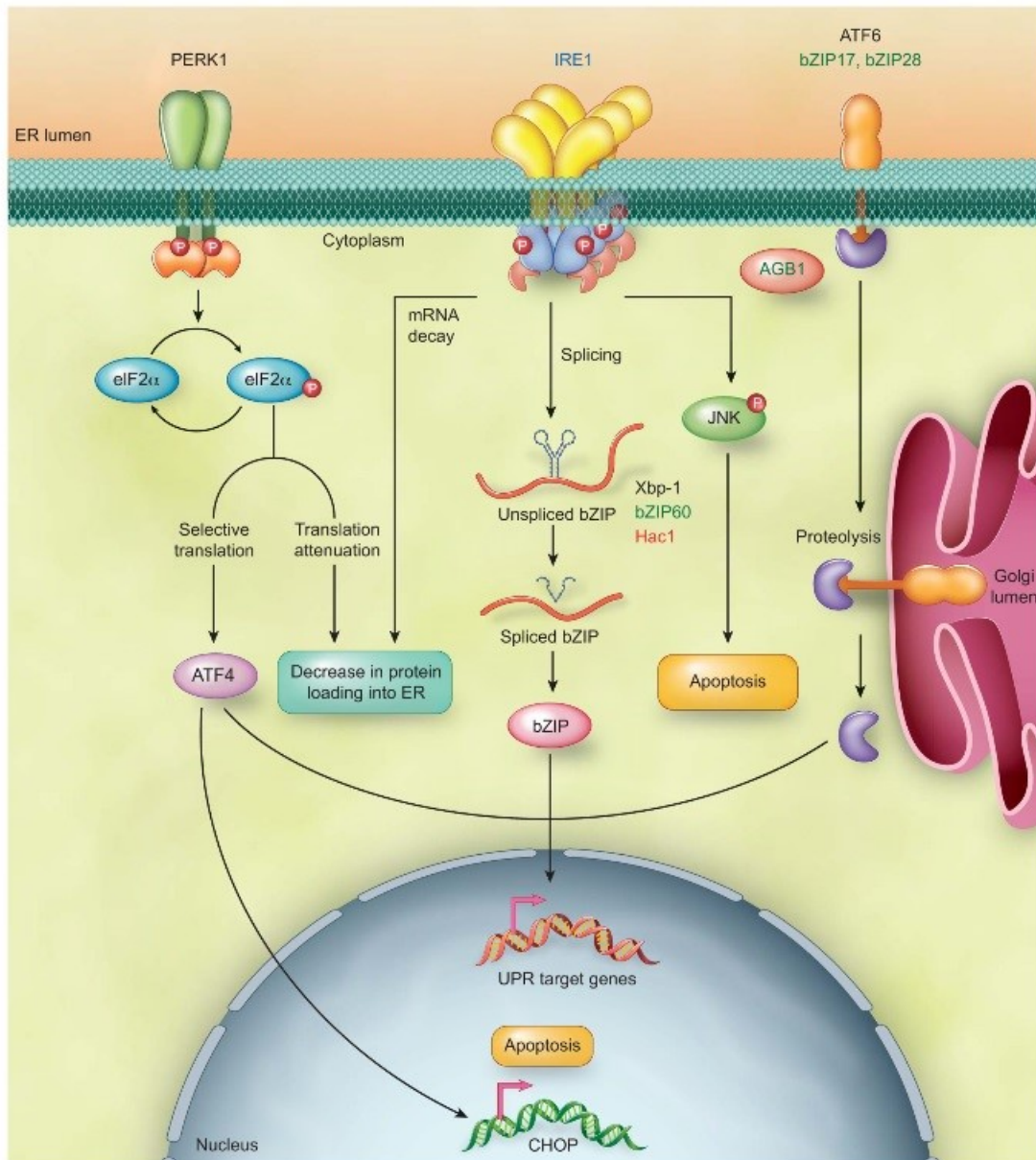


Figure 5.5: Schémas générale de la réponse UPR (d'après [220])

Il a été observé dans des cellules d'épithélium pulmonaire que l'activation de l'UPR par un stress RE est suivie d'une diminution significative du niveau d'ARN messager de CFTR et par une prise en charge par les ERAD réduisant ainsi sa concentration [206]. De plus, un niveau de stress du RE, de l'UPR et de la signalisation MAPK a été observé dans les cellules CF. Cette activation de l'UPR est associée à une hyper-inflammation des cellules mucoviscidrosiques qui ne parviennent plus à résoudre le stress ER. Ceci a pour conséquence de rendre les cellules épithéliales pulmonaires malades très sensibles avec des réponses, par exemple à l'infection microbienne, très exagérées [206]. Des études ont montré un lien entre les réponses inflammatoires

de l'épithélium bronchique humain et l'activation de la voie IRE-1/Xbp-1 [221]. Des cellules d'épithélium bronchique fraîchement isolées à partir de poumons de patients mucoviscidosiques infectés et enflammés présentent un niveau élevé d'Xbp-1 par rapport à des cellules normales non infectées et non enflammées [221]. De plus, l'exposition de cultures primaires d'épithélium bronchique normal au mucus provenant de patients mucoviscidosiques favorise l'augmentation d'Xbp-1 et l'accumulation du calcium dans le RE provoquant une augmentation de la production d'IL8 et montrant que le milieu des voies respiratoires mucoviscidosiques est capable de déclencher l'UPR par l'intermédiaire de Xbp-1 [221–224].

En plus de ces éléments de réponse au stress UPR, le RE contient dans sa lumière des chaperonnes liées au calcium (Ca^{2+}), dont la fonction principale est de replier les protéines et de réguler le stockage et la libération du Ca^{2+} [225]. Alors que CFTR n'est pas un canal dépendant du Ca^{2+} , plusieurs études ont été consacrées au rôle du Ca^{2+} du RE dans le trafic cellulaire de CFTR et plus particulièrement celui de CFTR-delF508. Il a été observé que CFTR-delF508 est séquestré dans le RE par des interactions avec des protéines chaperonnes, dont une, la calnexine, qui utilise le Ca^{2+} comme cofacteur, est une protéine résidente du RE [226]. Il a été montré que le Ca^{2+} est important dans la séquestration de CFTR-delF508 dans le RE en maintenant, notamment, son interaction avec la calnexine [221]. Cette accumulation dans le RE induit un stress oxydatif (UPR) et une inflammation. Cela suggère que l'un des facteurs contribuant à l'état inflammatoire des voies aériennes des patients mucoviscidosiques serait l'augmentation de la production de cytokines épithéliales des voies respiratoires des patients due au stress lié à l'accumulation en Ca^{2+} et donc de CFTR-delF508 dans le RE [223]. L'épithélium des voies aériennes des patients mucoviscidosiques joue un rôle central dans la réponse inflammatoire [214, 223, 227, 228].

5.3.3 Au niveau du plasma

Au niveau du plasma, une faible concentration en vitamines E, A et C qui s'accroît avec l'âge des patients a été observée [176]. On retrouve aussi de nombreux marqueurs de l'oxydation des lipides ainsi qu'une diminution de la concentration en GSH circulant (forme monomérique réduite du glutathion) alors que la forme GSSG n'est pas touchée (forme dimérique oxydée du glutathion) [212, 229–231]. De nombreux marqueurs du stress oxydatif comme la lipide peroxydation ont été mesurés dans le plasma des patients mucoviscidosiques et sont associés à une diminution de la concentration en antioxydant dans le plasma [195, 230]. Parmi les marqueurs de la peroxydation des lipides retrouvés augmentés chez les patients atteints de mucovisci-

dose, on peut citer le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et les isoprostanes qui sont les produits finaux de la peroxydation des lipides [176, 232]. Ainsi un niveau élevé de peroxydation des lipides peut être associé à des dysfonctionnements pulmonaires induisant des lésions dans la structure membranaire [233]. Dans la mucoviscidose, en plus de l'atteinte pulmonaire, les patients présentent aussi dès la naissance une atteinte intestinale caractérisée par une diminution importante de l'absorption de nutriments et d'oligoéléments [234]. Ceci va affecter l'homéostasie systémique de nombreux éléments importants pour les fonctions enzymatiques très impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif et l'inflammation. Parmi ces éléments on trouve les métaux de transition comme le zinc, le fer et le cuivre :

- le zinc agit comme cofacteur pour des enzymes importantes pour la défense antioxydante et induit aussi la synthèse de métallothionéines dans la protection contre les ROS [235]. Dans la mucoviscidose une diminution de la concentration en zinc dans le plasma d'enfants a été observée à de plusieurs reprises, mais ne semble pas toucher tous les patients [236, 237] ;
- le fer dont l'excès est connu pour générer du stress oxydatif, notamment dans la conversion par la réaction d'Haber-Weiss (fer dépendante) de O_2^- et H_2O_2 en radical OH^\bullet [238]. Chez les patient mucoviscidosiques on retrouve dans leur LBA et dans le sérum une forte concentration en fer qui diminue avec l'aggravation de la maladie facilitant par la suite l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* [239, 240] ;
- le cuivre est un élément indispensable mais qui peut s'avérer dangereux s'il n'est pas régulé par l'organisme. La concentration ainsi que la distribution de cuivre sont finement régulées afin d'éviter une présence de cuivre libre trop importante qui est capable d'entraîner une production de ROS et des dégâts oxydatifs sévères. Les partenaires impliqués dans l'homéostasie du cuivre sont dans l'ensemble très bien documentés (Figure 5.6). Le cuivre est le métal qui joue le rôle le plus déterminant dans le stress oxydatif, notamment dans la défense antioxydante. Dans des conditions de déficience en cuivre, plusieurs éléments de la défense antioxydante sont touchés, comme la Cu/Zn-SOD [241] et la céruloplasmine [242, 243] dont l'activité est réduite car elles utilisent toutes deux le cuivre comme cofacteur dans leurs activités. Cette déficience peut aussi toucher l'activité de la catalase [244, 245], des métallothionéines [246, 247] et du GSH [248, 249]. Des études indiquent que les individus atteints de mucoviscidose présentent une distribution altérée en cuivre en comparaison avec des patients sains [240, 250]. Les résultats de ces études semblent suggérer qu'il existe un défaut dans l'homéostasie du cuivre dans le cas de la mucoviscidose dont l'origine reste inconnue. S'agit-il d'une diminution de l'absorption intesti-

nale du cuivre, de la conséquence de l'inflammation chronique dont les malades souffrent ou d'un effet associé à la dérégulation du transport cuprique au niveau des cellules bronchiques? Les auteurs de ces études suggèrent la présence d'un lien entre la sévérité de la maladie et l'activité des enzymes dépendantes du cuivre [250].

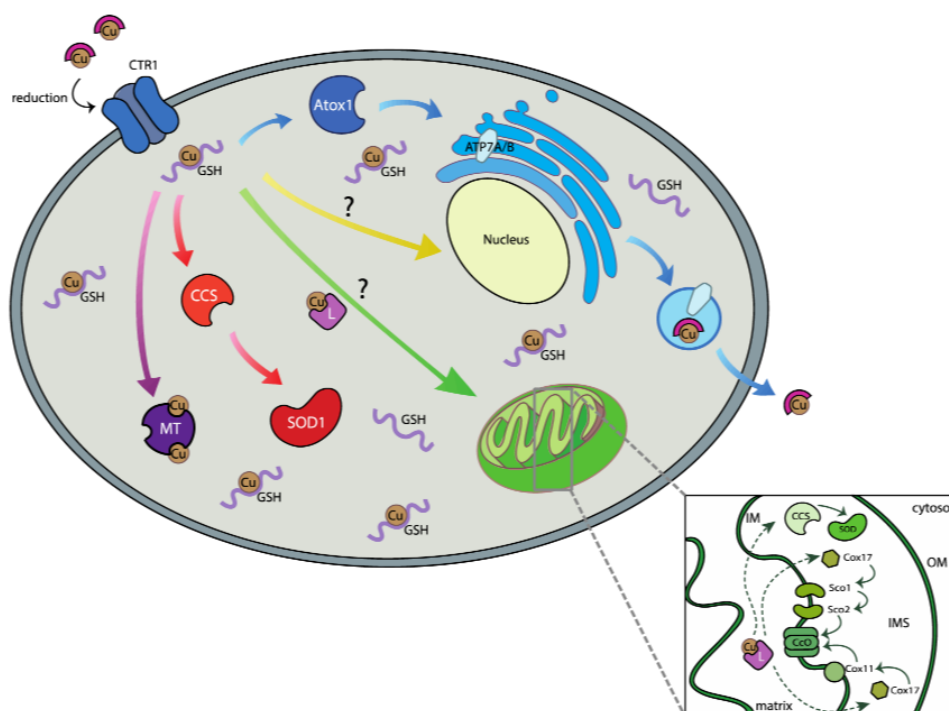


Figure 5.6: Schéma simplifié de l'homéostasie du cuivre dans les cellules eucaryotes (d'après [251])

Globalement, un défaut du système antioxydant semble être associé à toutes les catégories de mutations identifiées sur le gène CFTR. Chez les patients mucoviscidosiques, une défense antioxydante inadéquate est associée à une augmentation du stress oxydatif qui contribue au déclin de la fonction pulmonaire. Mais l'origine de ce stress oxydatif est encore très discutée. Néanmoins il est important de rappeler que le GSH joue un rôle important dans la chélation des métaux [252]. Il prend en charge le cuivre avant d'être incorporé dans les métallo-chaperonnes telles que la SOD1 qui l'utilise pour son activité antioxydante [253, 254].

Ces deux éléments sont hautement perturbés et semblent être en lien avec le défaut de l'homéostasie du cuivre observé chez les patients atteints de mucoviscidose. C'est à

la suite de ces observations que nous avons eu pour objectif d'identifier l'implication de défaut de l'homéostasie du cuivre dans la mucoviscidose.

La protéine prion cellulaire

6.1 La découverte du Prion

L'histoire du Prion cellulaire commence au 18^{ème} siècle avec plusieurs observations sur une maladie étrange affectant les moutons de Mérinos qui cause un comportement anormal, tel qu'une démarche altérée, un léchage excessif et des démangeaisons intenses qui obligent les moutons affectés à se gratter (Scrape) contre les clôtures. La « tremblante » (Scrapie), c'est ainsi qu'elle est nommée. Elle est plus tard désignée comme le premier membre d'une nouvelle classe de désordres neurologiques connus sous le nom d'encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). En 1920, deux neurologistes, Hans Gerhard Creutzfeldt et Alfons Maria Jakob, décrivent un désordre neurologique de l'homme, d'étiologie inconnue, mais qui semble avoir quelques similitudes avec la tremblante [255, 256]. En 1938 Cuille et Chelle émettent l'hypothèse que la maladie de la tremblante du mouton est due à un virus lent (Slow virus) [257]. Pendant que plusieurs chercheurs continuent à orienter leurs recherches dans ce sens, d'autres scientifiques découvrent un nouveau désordre neurologique humain en Papouasie-Nouvelle Guinée, appelé Kuru (par rapport à la tribu des Kuru), qui rappelle beaucoup les symptômes décrits par Creutzfeldt-Jakob et la tremblante des moutons. Comme pour ces deux dernières, la maladie de Kuru n'est pas classée comme EST pendant plusieurs années (Figure 6.1).

Prion disease	Natural host species	Etiology
sCJD	Humans	Unknown (somatic <i>PRNP</i> mutation?)
Familial Creutzfeldt-Jakob disease (fCJD)	Humans	Familial (germ line <i>PRNP</i> mutation)
Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease (iCJD)	Humans	Surgical procedures (infection)
vCJD	Humans	Ingestion of BSE-contaminated food; transfusion medicine (infection)
Kuru	Humans	Ingestion, ritualistic cannibalism (infection)
Fatal Familial Insomnia (FFI)	Humans	Familial (germ line <i>PRNP</i> mutation)
Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrome	Humans	Familial (germ line <i>PRNP</i> mutation)
Scrapie	Sheep, goats	Infection, natural; mode of transmission unclear
Chronic Wasting Disease (CWD)	Deer, Elk	Infection; mode of transmission unclear
BSE	Cattle	Ingestion of BSE-contaminated feed (infection)
Transmissible mink encephalopathy	Mink	Ingestion (infection); Origin unclear
Feline spongiform encephalopathy	Cats	Ingestion of BSE-contaminated feed (infection)
Spongiform encephalopathy of zoo animals	Zoologic bovinds, primates	Ingestion of BSE-contaminated feed (infection)

Figure 6.1: Liste des maladies à Prion humaines et animales (d'après [258])

La nature infectieuse de ces maladies a été d'abord démontrée en 1946 sur la maladie de la tremblante où l'inoculation du fluide cérébral spinal d'un mouton atteint dans

un mouton sain a permis de transmettre la maladie (Gordon 1946). En 1959, il est prouvé que Kuru, la tremblante et Creutzfeldt-Jakob sont des formes distinctes de la même neuropathie [259]. Par la suite, les expériences d'inoculations réalisées chez des primates à partir de prélèvements *post-mortem* sur des patients diagnostiqués par les pathologies de Kuru ou de Creutzfeldt-Jakob valident le caractère transmissible de ces maladies [260, 261]. John Stanley Griffith est le premier à spéculer que l'agent Scrapie est protéique. Il propose trois mécanismes pour expliquer [262] :

- que la protéine peut être infectieuse ;
- que cette infection est susceptible de se produire de façon spontanée ;
- qu'elle peut être liée à des mutations génétiques.

Plusieurs chercheurs ont suivi Griffith et ont accumulé des données confirmant que Scrapie est dépendante de protéines. En 1982, Stanley Prusiner est le premier à suivre et à enrichir l'hypothèse selon laquelle Scrapie est une protéine à qui il donne le nom de Prion (*Proteinaceous infectious particle*) afin de décrire l'agent pour lequel il obtient plus tard le prix Nobel. Prusiner et d'autres ont renforcé son hypothèse en isolant la protéine Prion et en la désactivant avec succès par l'utilisation de protéases. Ils ont également montré que les radiations et les nucléases ne sont pas capables de la neutraliser excluant ainsi son possible caractère viral [263–267].

En 1985, Bruce Chesebro et Richard Race isolent le transcrit de l'ARNm de la séquence protéique qui code pour la protéine Prion à la fois dans les cerveaux infectés et dans les cerveaux non infectés. Le gène est appelé *PRNP* et il code pour la protéine prion cellulaire PrP^c [268], celle-ci est une protéine dont la perte du niveau de repliement serait responsable de la naissance de la forme Scrapie PrP^{sc} qui est à l'origine des EST.

La conversion de la PrP^c en PrP^{sc} est l'événement clé responsable de la propagation des effets pathogènes des EST. En effet, peu de choses semble les différencier : elles sont codées par le même gène ; dans les cellules infectées le taux d'ARNm de la protéine normale PrP^c n'est pas altéré ; il n'y a aucune modification post-traductionnelle qui les différencie et l'analyse de la structure primaire n'a révélé aucune différence entre PrP^c et PrP^{sc}. Il en a été déduit que cette conversion implique un changement de conformation [269, 270]. Les seules différences observées sont que PrP^{sc} est caractérisée par sa résistance à la digestion par les protéases (notamment la protéase K), son insolubilité et sa structure principalement constituée de feuillets β (43 % de feuillets β contre 30 % d'hélices α) [266, 271]. PrP^c par contre, est une protéine soluble riche en hélices α (42 %), faible en feuillets β (3 %) et très sensible à la digestion par les protéases [272] (Figure 6.2).

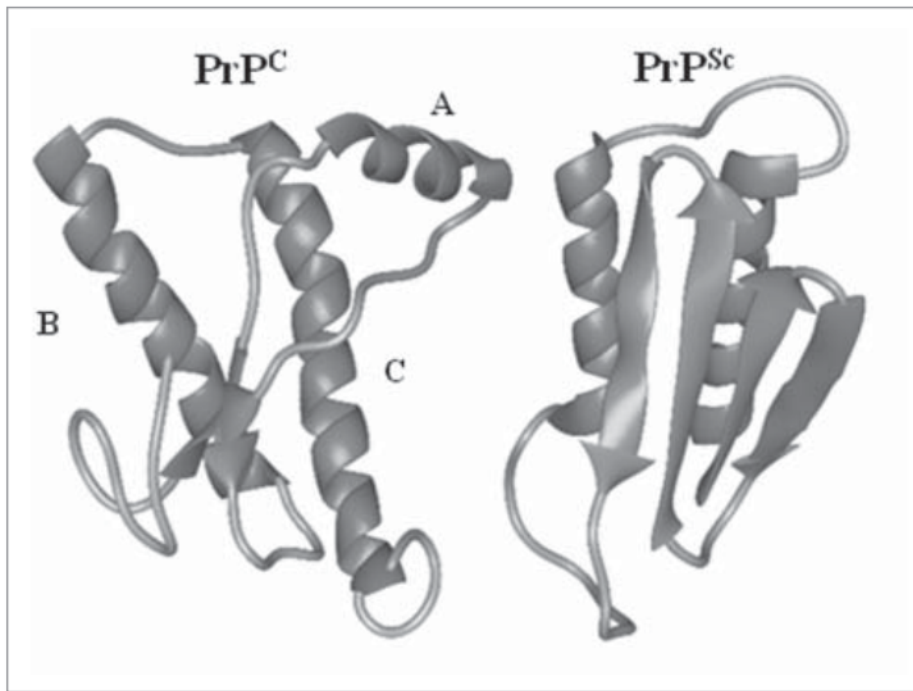


Figure 6.2: Représentation schématique de la comparaison des structures de la PrP^C et PrP^{Sc} (d'après Atkinson CJ., Prion. 2016 ;10(1) :63-82)

Les EST résultent donc de la conversion de la PrP^C en PrP^{Sc}. Peu importe l'origine de cette dernière (exogène, mutation ou conversion spontanée) elle sert de modèle à PrP^C afin de faciliter sa conversion, conduisant à une accumulation de la PrP^{Sc} dans les cellules neuronales entraînant par la suite leur mort [273] (Figure 6.3).

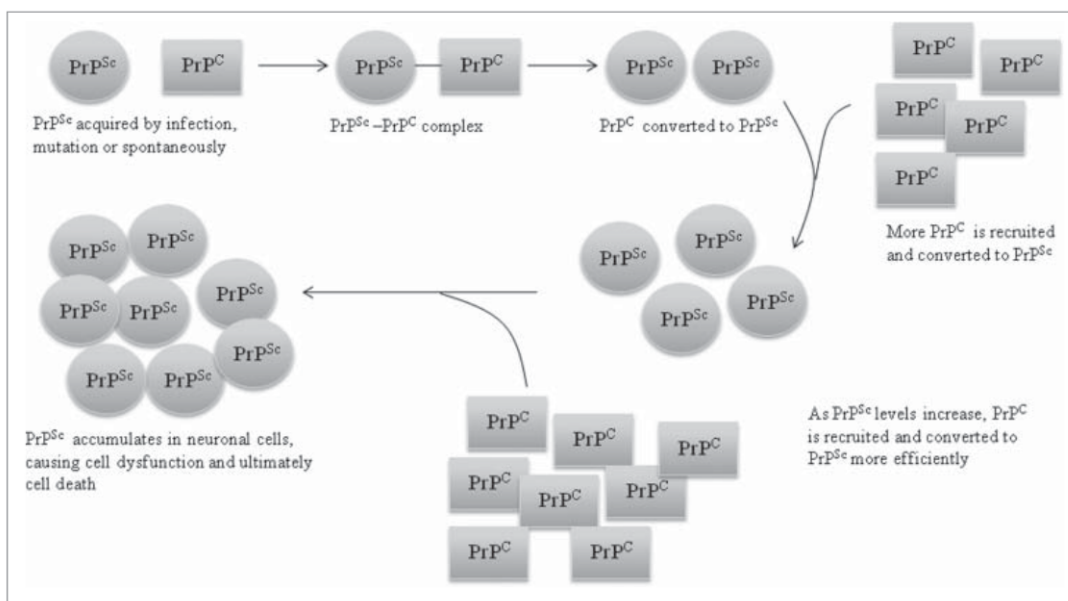


Figure 6.3: Schéma de la propagation de la PrP^{Sc} dans les cellules neuronales (d'après [274])

6.2 La protéine prion cellulaire (PrP^c)

Elle est codée par le gène *PRNP* localisé sur le bras court du chromosome 20 chez l'homme. Ce gène est constitué de deux ou trois exons. Trois exons dans le cas du rat, de la souris ou du mouton et deux exons pour le hamster et l'homme [275, 276]. Chez toutes les espèces le cadre de lecture (ORF) est situé dans le dernier exon [277]. Du fait de l'absence de TATA box au niveau de son promoteur, *PRNP* est souvent étiqueté comme un gène de ménage. Pourtant, *PRNP* est dépendant de plusieurs facteurs cellulaires et est le site de fixation potentiel de plusieurs facteurs de transcription. Parmi ces facteurs, on trouve le facteur de croissance NGF (*Nerve Growth Factor*) qui régule positivement l'expression du gène [278]. Sur son promoteur a été trouvée, après analyse de la structure primaire, une boîte CCAAT (CATbox) et plusieurs autres séquences consensus de liaison aux facteurs de transcriptions AP-2, AP-1 et Sp-1. De plus, on trouve aussi trois sites de fixation des métaux : MRE (*Metal Responsive Element*) en position -2537, -1083 et -90 [279, 280].

6.2.1 Structure de la protéine PrP^c

Chez l'homme, PrP^c est une sialoglycoprotéine de 253 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 35 kDa. Dans sa partie N-terminale, un peptide signal de 22 acides aminés, qui permet la translocation de la PrP^c dans le RE, est clivé après l'entrée de la protéine dans ce dernier. Dans sa partie C-terminale, un autre peptide signal hydrophobe de 23 acides aminés est lui aussi clivé pour être remplacé par le groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) à la sérine en position 231. Ce groupement permet l'ancrage de la protéine à la surface cellulaire au niveau des rafts riches en sphingolipides et cholestérols. L'ensemble de ces modifications produit une protéine mature de 209 acides aminés. La structure tridimensionnelle de la protéine a été déterminée par RMN sur la protéine recombinante humaine hPrP (23-230) et deux fragments C-terminale hPrP (90-230) et hPrP (121-230) [281, 282].

La protéine prion cellulaire contient (Figure 6.4) :

- une extrémité N-terminale (Nt) flexible comprise entre les résidus 23 et 124. Elle contient cinq motifs de huit acides aminés (PHGGGWGQ) qui lient avec une grande affinité l'ion cuivre Cu²⁺. Cette liaison a lieu avec les résidus HGGGW [283]. In vitro, cette séquence a plus d'affinité pour le Cu²⁺ que pour le Cu⁺ ou tous les autres ions métalliques [283] ;

- une extrémité C-terminale (Ct) globulaire ancrée à la membrane plasmique, d'environ 100 acides aminés, des résidus 125 à 228. Ce domaine est composé de trois hélices α , correspondant aux acides aminés 144-154, 173-194 et 200-228, entrecoupées par deux feuilletts β antiparallèles des résidus 128-131 et 161-164. La troisième hélice α et le deuxième feuillet β sont reliés par une boucle flexible. On y retrouve deux sites de N-glycosylation (résidus 183 et 199), qui peuvent ou non être occupés, donnant trois formes distinctes de la PrP^c : non glycosylée (25 kDa), mono-glycosylée (25 à 30 kDa) et bi-glycosylée (35 kDa). Elle comporte aussi un seul pont disulfure entre les deux résidus cystéines 179 et 214 qui fait le lien entre l'hélice 2 et 3 et qui sert à stabiliser cette extrémité de la PrP^c ;
- une région fortement conservée hydrophobe TMD (*Trans Membrane Domaine*) des résidus 110 à 135 se trouve entre les deux extrémités. Sa fonction n'est pas encore connue mais elle semble liée à la conversion de la PrP^c en PrP^{sc} [284]. Cette structure de la PrP^c est modifiée par la fixation du cuivre, par la présence de ponts disulfures intra et inter-moléculaires ou par glycosylation.

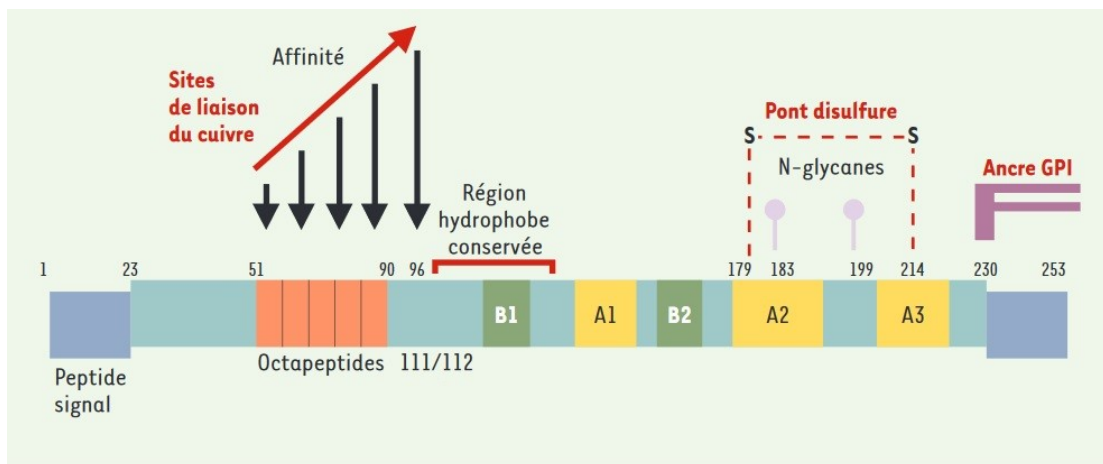


Figure 6.4: schémas de la structure primaire de la PrP^c dans les cellules neuronales (d'après [285])

La structure de la PrP^c est très conservée chez les mammifères, quel que soit le degré d'homologie de séquences. L'expression de la PrP^c commence dès l'embryogenèse. Chez l'adulte, une forte expression a été détectée dans le cerveau, dans la moelle épinière et dans les neurones [286, 287]. Mais PrP^c est aussi exprimée dans les cellules gliales, dans les cellules des tissus périphériques (intestin, muscles, placenta...) et dans le sang [288, 289].

6.2.2 Voie de synthèse, maturation et dégradation

Une fois synthétisée, la protéine prion non mature est transloquée dans le RE grâce à son peptide signal N-terminal. À ce niveau, le peptide signal T-terminal est clivé ainsi que le peptide C-terminal. Le peptide signal est remplacé par une ancre GPI. Puis, on observe la formation d'un pont disulfure ainsi que l'ajout de deux chaînes d'oligosaccharide avant que la protéine soit envoyée dans l'appareil de Golgi puis à la membrane plasmique au niveau des domaines rafts. En plus de cette forme principale à ancre GPI, deux autres formes topologiques transmembranaires du Prion ont été observées dans le RE : (Ctm)PrP (ou C-transmembrane PrP) et (Ntm)PrP (ou N-transmembrane PrP) [290] (Figure 6.5).

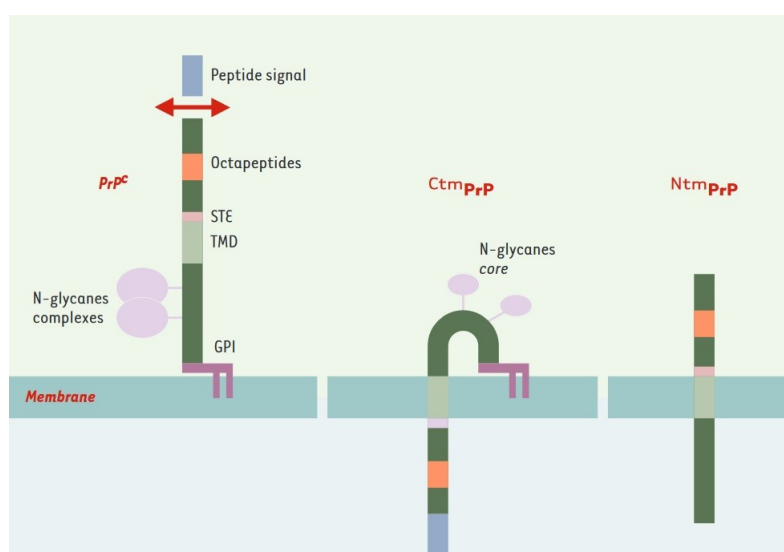


Figure 6.5: Schémas des différentes formes topologiques de la PrP^c dans les cellules neuronales (d'après [285])

(Ctm)PrP est glycosylée, elle possède une ancre GPI, son peptide signal N-terminal n'est pas clivé et sa partie C-terminale est orientée dans la lumière du RE [291]. (Ntm)PrP, elle, n'est pas glycosylée, elle ne possède pas d'ancre GPI et elle présente une conformation inversée par rapport à (Ctm)PrP (c'est sa partie N-terminale qui fait face à la lumière du RE) [291, 292].

Ces formes transmembranaires qui s'accumulent dans le RE sont prises en charge par le système de dégradation des protéines associé au RE (ERAD), qui le transloque dans le cytosol et les dégradent par le système ubiquitine/protéasome. Pour celles qui arrivent à la membrane, elles sont par la suite internalisées par des clathrines et/ou des cavéolines [293, 294] (Figure 6.6).

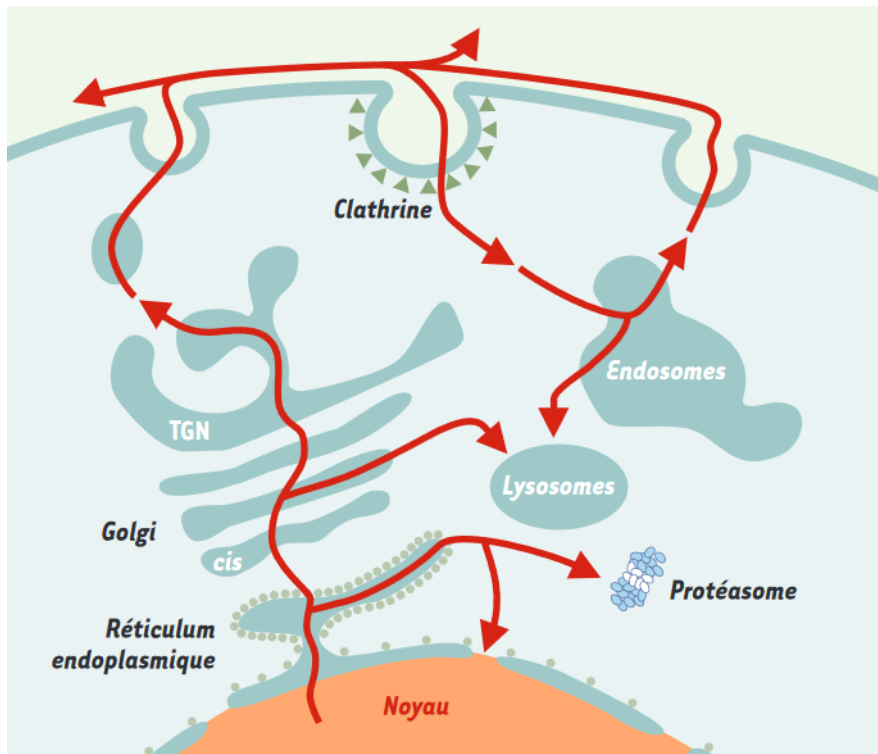


Figure 6.6: Schémas du trafic cellulaire de la PrP^c dans les cellules neuronales (d'après [285])

6.2.3 Rôles du Prion cellulaire

i Prion et jonction cellulaire

L'adhésion cellulaire est une des fonctions régulées par la protéine prion cellulaire :

- dans les tissus périphériques, PrP^c est localisée au niveau des jonctions cellulaires dans des cellules endothéliales où elle est co-localisée dans les rafts avec PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*). PrP^c et PECAM-1 participent tous deux à la migration des monocytes [295] ;
- dans les cellules épithéliales intestinales, PrP^c a aussi été retrouvée au niveau des jonctions cellulaires où elle est co-localisée avec la E-cadhérine et la protéine kinase Src, en interaction directe uniquement avec Src [296, 297]. Dans des cellules épithéliales où le gène codant pour la protéine PrP^c a été invalidé, on a observé que les niveaux d'adressage à la membrane des E-cadhérine, desmoplakine, plakoglobine, occludine, ZO-1 et claudine-4 sont diminués, suggérant que la protéine PrP^c pourrait jouer un rôle important dans la régulation des jonctions cellulaires [217, 297, 298].

ii Activité cytoprotectrice du Prion

D'un point de vue structural, plusieurs régions sont impliquées dans l'activité cytoprotectrice du Prion :

- une première région à l'extrémité N-terminale du Prion inclut quatre résidus chargés positivement qui jouent un rôle important dans le transport endocytaire du Prion [299, 300] et dans sa localisation dans les rafts lipidiques [301] ainsi que dans les compartiments endosomales où la PrP^c peut exercer son activité cytoprotectrice [302, 303] ;
- la deuxième région est l'octa-peptide répété, connu pour sa grande affinité pour les ions cuivre et qui joue aussi un rôle dans la fonction cytoprotectrice. Des souris invalidées pour cette région présentent une ataxie sévère et une mort neuronale importante. Cette observation n'a été faite que chez la souris [304], ceci étant probablement dû à une réponse différente du Prion en fonction du type cellulaire ou du contexte de l'étude ;
- enfin la suppression de la région située au niveau de la partie C-terminale qui correspond à la séquence de l'ancre GPI n'altère pas l'activité cytoprotectrice du Prion [303].

En plus de l'activité de ces régions, d'autres expériences ont apporté la preuve que la présence de la protéine prion cytoplasmique peut parfois être toxique pour les cellules [305, 306]. La protéine Prion semble aussi être impliquée dans de multiples voies de signalisation liées à la survie cellulaire (Figure 6.7). Une autre activité cytoprotectrice observée est la protection des cellules contre le stress oxydatif. La protéine Prion elle-même semble participer à l'élimination des ROS. En effet, on a observé qu'elle présente une activité SOD-like en présence de cuivre [307, 308]. Elle peut aussi agir indirectement pour protéger les cellules contre le stress oxydatif en régulant l'activité d'autres protéines comme la Cu/Zn-SOD. Une étude a montré que des souris invalidées pour la protéine PrP^c présentaient plus de dommages associés au stress oxydatif et à une diminution de l'activité SOD que les souris contrôles. Une réduction de la concentration en glutathion réductase et en d'autres enzymes oxydantes a aussi été reportée dans les neurones des souris invalidées pour PrP^c [309–313].

Il est aussi possible que PrP^c agisse en amont ou en aval des ROS pour protéger les cellules du stress oxydatif. Dans certaines situations, le stress oxydatif peut activer les voies apoptotiques [314]. Dans ces cas, l'effet anti-apoptotique du Prion peut compter comme une des habiletés de la protéine à protéger la cellule contre le stress oxydatif [315, 316].

De nombreuses études ont montré le rôle protecteur de la PrP^c contre le stress oxydatif d'origine cuprique. Le cuivre libre (Cu²⁺) est hautement toxique et sa concentration intracellulaire doit être finement régulée car il est capable de générer des ROS (par la réaction de Fenton). L'activité antioxydante de la PrP^c a été attribuée à sa région liant le cuivre. Par exemple une étude sur des neurones n'exprimant pas la protéine Prion a montré que ces cellules sont plus vulnérables lorsqu'elles sont exposées à une forte concentration en cuivre que les neurones exprimant la protéine Prion. Cet effet a été annulé par le traitement des cellules avec un peptide PrP^c [317, 318].

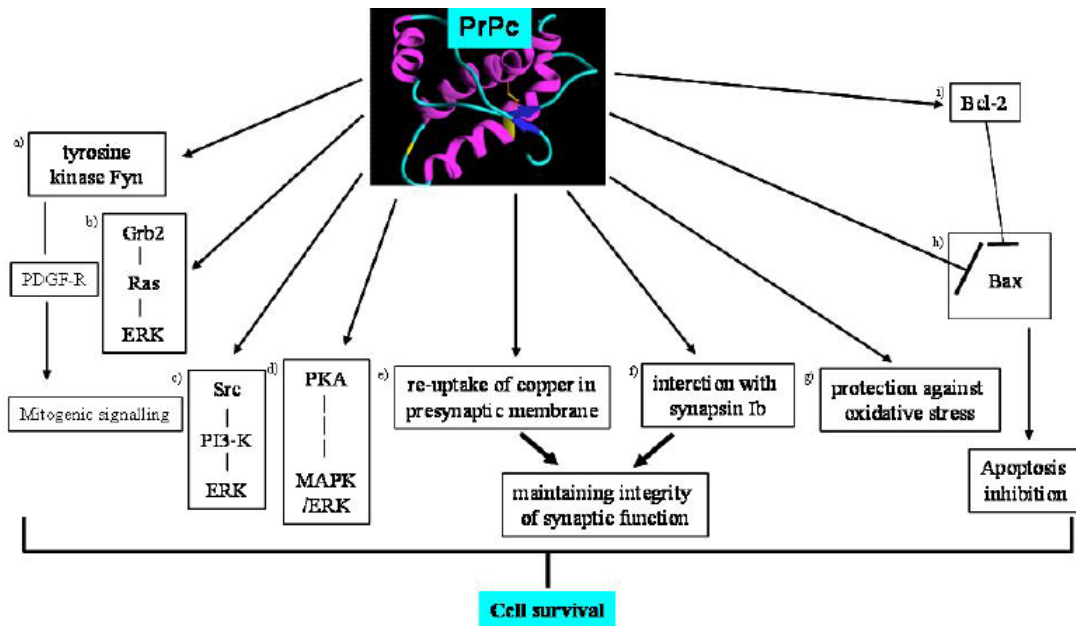


Figure 6.7: Différentes voies de signalisation liées à la survie cellulaire dans lesquelles la protéine Prion a rôle déterminant. (d'après [319])

iii Prion et inflammation

Il a été prouvé que la protéine Prion joue un rôle dans les processus inflammatoires au niveau neuronal [320, 321], et aussi dans les tissus périphériques. On a constaté que des souris sur-exprimant la protéine Prion cellulaire sont plus résistantes à l'induction de colites que des souris KO pour la protéine Prion. Elles présentent aussi une production réduite en cytokines pro-inflammatoires et une activité réduite pour STAT3 (un facteur de transcription qui a pour rôle d'intervenir dans l'inflammation, l'apoptose et l'immunité) montrant ainsi le rôle cytoprotecteur et inflammatoire du Prion [322]. Une autre étude, réalisée sur une lignée de chèvres norvégiennes naturellement dépourvues de Prion et traitées par du LPS (LipoPolySaccharide) d'*Escherichia coli*, a montré que l'apparition de signes cliniques était plus tardive que pour les chèvres pourvues naturellement de Prion. Une analyse du transcriptome a montré que de nombreux gènes associés à la réponse immunitaire, tels que IL-12 et IL-14 ou un régulateur de l'apoptose IFI6, sont altérés, ce qui renforce ainsi le rôle cytoprotecteur et inflammatoire du Prion [323].

Une dernière étude réalisée sur les cellules M2 de mélanome humain et BxPC-3 d'adénocarcinome pancréatique a montré le rôle critique de la PrP^c dans la signalisation du TNF α . Lorsque *PRNP* est supprimé dans ces cellules, les régulations à la hausse de l'expression des protéines p-IKK α/β , p-p65 et p-JNK, et à la baisse de la protéine

$I\kappa\alpha$, qui sont toutes des intermédiaires de la cascade de signalisation du $TNF\alpha$, ne sont plus observées. Mais les réponses de p-p65 et p-JNK sont restaurées lorsque *PRNP* est réintroduit. Le $TNF\alpha$ active également le $NF-\kappa B$ et augmente sa propre production dans les cellules M2 normales, mais pas dans les cellules M2 PrP-KO, montrant ainsi que PrP^c améliore les réponses au $TNF\alpha$, en favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui suggère le rôle important potentiel de la PrP^c dans l'inflammation [298, 324].

iv Prion et cuivre

Le cuivre est un cofacteur essentiel de nombreuses enzymes qui catalysent les réactions d'oxydoréduction. Hautement réactive, la cellule dispose de plusieurs mécanismes d'import et de transport du cuivre. Un défaut dans le métabolisme du cuivre est lié à de nombreuses maladies notamment neurodégénératives. Plusieurs études montrent en effet la connexion entre PrP^c et les ions cuivre [325, 326] (Figure 6.8).

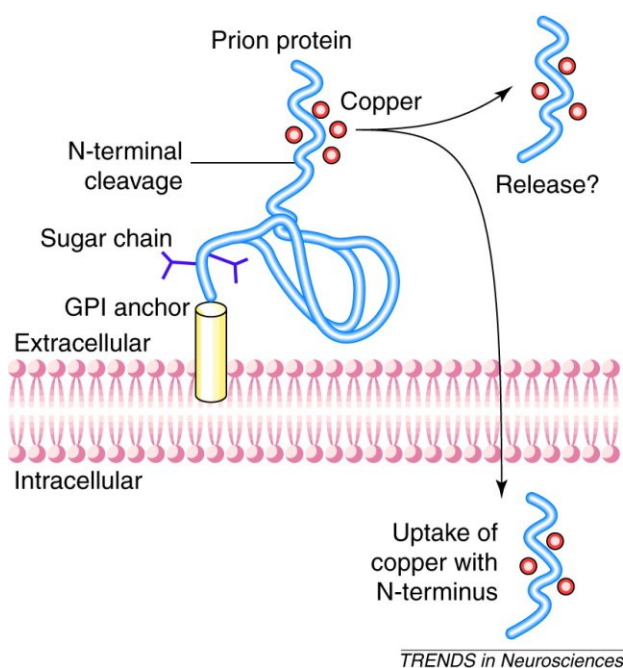


Figure 6.8: Représentation du devenir du Prion cellulaire et de sa liaison au cuivre (d'après [307])

Le cuivre est un des ligands non discutés de la PrP^c, cependant, le rôle physiologique de cette interaction reste cependant très controversé [317, 327]. Il est connu que la PrP^c peut lier jusqu'à six atomes de cuivre simultanément avec une forte affinité,

ce qui a pour conséquence un changement dans la structure du Prion. Cependant, les conséquences physiologiques de ce changement ne sont pas encore clairement identifiées [328, 329].

Les ions cuivre altèrent aussi les propriétés biochimiques et cellulaires de la PrP^c : au niveau neuronal ils provoquent une agrégation du Prion cellulaire [330] et son endocytose dans les puits à clatherine et donc son expulsion des rafts lipidiques, réactions qui nécessitent une liaison au cuivre [331, 332]. Cependant, si la même expérience porte sur des cellules du placenta, le cuivre induit une augmentation de l'expression membranaire du Prion, suggérant que l'effet physiologique de l'interaction de la PrP^c avec le cuivre diffère en fonction du type d'organe dont sont originaires les cellules [333]. En se basant sur l'effet du cuivre sur le trafic cellulaire du Prion, on suppose que la protéine Prion joue le rôle de récepteur pour l'absorption et donc assure l'efflux des ions cuivre [317, 334]. Cependant, les mécanismes cellulaires de l'implication de la PrP^c dans le contrôle de l'effet du cuivre et donc dans la protection de la cellule contre le stress oxydatif d'origine cuprique restent encore très mal connus.

Il a été prouvé que le stress, l'inflammation et une exposition chronique à une forte concentration en cuivre sont capables de moduler l'expression du Prion. Ces trois éléments critiques sont altérés dans la mucoviscidose, et font ainsi du Prion cellulaire le candidat idéal à étudier dans le cadre de notre projet.

II

Objectifs

Aujourd'hui, dans l'étude de la mucoviscidose, l'inflammation et le stress oxydatif sont considérés, à côté de l'infection bactérienne et fongique, comme deux composantes majeures de la destruction progressive, chronique et probablement génétiquement programmée du tissu épithélial bronchique. La conséquence est fatale avec l'installation d'une insuffisance respiratoire qui, malheureusement, à long terme conduit à long terme au décès du patient. Chez les jeunes patients atteints de mucoviscidose, l'apparition d'une inflammation précoce, en absence d'infection, semble faire l'unanimité. Cependant, les causes de sa survenue restent encore inconnues.

Il est bien établi qu'un stress oxydatif mal contrôlé peut être à l'origine du déclenchement de l'inflammation. Cependant le lien entre ces deux processus n'est pas encore bien établi concernant la mucoviscidose. Plusieurs données cliniques mettent en avant l'importance de l'homéostasie des métaux de transition (Cu, Zn, Fe et Mn). Mais, peu ou pas de données cellulaires sont disponibles concernant leur implication dans le stress oxydatif et dans l'inflammation de l'épithélium bronchique mucoviscidosique.

La littérature est riche en données montrant que les cellules épithéliales pulmonaires mucoviscidosiques sont enflammées et présentent un niveau élevé de stress oxydant. Cependant, ces résultats sont très conflictuels, car ils ont été obtenus sur différentes lignées cellulaires ou cultures primaires provenant de divers tissus. La détermination du profil inflammatoire et la mesure du stress oxydant n'ont jamais été obtenues sur une même lignée cellulaire, ce qui rend la comparaison des résultats très difficile. De plus, les lignées isogéniques (même fond génétique) corrigées par la protéine CFTR normale ont été rarement utilisées pour caractériser l'inflammation et le stress oxydatif.

Partant de ces constats, mon projet avait comme objectifs de :

- ☞ déterminer le profil du stress oxydatif dans les cellules bronchiques humaines saines et mucoviscidosiques, dans les conditions de base et après correction par la protéine CFTR normale ;
- ☞ déterminer le profil de l'inflammation dans les cellules bronchiques humaines saines et mucoviscidosiques, dans les conditions de base et après correction par la protéine CFTR normale ou par des correcteurs pharmacologiques ;
- ☞ étudier l'implication de l'activité de la protéine CFTR-canal chlorure dans ces deux processus ;
- ☞ étudier le rôle du cuivre dans la réponse inflammatoire et le déclenchement du stress oxydatif.

Lorsque nous avons identifié une dérégulation de l'homéostasie du cuivre dans les cellules mucoviscidiques, nous avons caractérisé le niveau d'expression de protéines clés du transport et/ou de la liaison de ce métal. Parmi les différents candidats, la protéine prion cellulaire (PrP^c) présentait un profil d'expression très intéressant. Cependant, rien encore dans la littérature n'a été publié sur l'expression, la régulation et le rôle de cette protéine dans les cellules épithéliales bronchiques animales et humaines saines.

Ainsi, dans la dernière partie de ma thèse je me suis intéressée à :

- caractériser l'expression et la régulation de la protéine PrP^c dans les cellules bronchiques humaines ;
- déterminer sa localisation et sa distribution cellulaire et tissulaire ;
- étudier son rôle dans la protection de la barrière jonctionnelle contre le stress oxydatif, d'origine cuprique.

L'ensemble des résultats obtenus vont faire l'objet de trois publications :

1. **Amal Kouadri**, Johanna Cormenier, Sylvain Chauvet, Laurence Macari, Peggy Charbonnier, Pierre Richaud, Isabelle Michaud-Soret, Nadia Alfaïdy and Mohamed Benharouga.

Copper Homeostasis and Oxidative Stress in Polarized Cystic Fibrosis Human Bronchial Epithelia : Role in Inflammation Responses (en cours de soumission).

2. **Amal Kouadri**, Sylvain Chauvet, Laurence Macari, Nadia Alfaïdy, and Mohamed Benharouga.

Inflammatory profile of cystic fibrosis bronchial epithelial cells following the recovery of CFTR function : Correctors versus gene expression (en cours de soumission).

3. **Amal Kouadri**, Mariam El kathib, Sylvain Chauvet, Laurence Macari, Pierre Richaud, Chrystelle Coraux, Isabelle Michaud-Soret, Nadia Alfaïdy and Mohamed Benharouga.
The Cellular Prion Protein Expression and Functional Importance in Human Bronchial Epithelia : Role in Stress-Protective Signaling and Junctional Barrier (en cours de soumission).

III

Résultats

Homéostasie du cuivre et stress oxydant dans l'épithélium bronchique humain mucoviscidosique : rôle dans les réponses inflammatoires

1.1 Introduction

La mucoviscidose est une maladie génétique, à transmission autosomique et récessive caractérisée par un transport anormal d'ions à travers la membrane apicale de l'épithélium intestinal et pulmonaire, causant la formation d'un mucus visqueux [335]. La mucoviscidose est causée par des mutations du gène *CFTR* qui code pour un canal chlorure transmembranaire la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) régulée par l'AMPc [336]. À ce jour, 2023 mutations ont été identifiées sur le gène CFTR et classées selon leurs conséquences sur l'activité, l'expression ou la localisation de la protéine CFTR (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). La mutation la plus fréquente correspond à la délétion de la phénylalanine (F) en position 508 de la protéine CFTR (delF508-CFTR). Cette mutation lui confère une conformation anormale et entraîne sa séquestration et sa dégradation dans le RE [337]. L'absence de CFTR fonctionnel à la membrane plasmique entraîne la formation d'un mucus épais, qui favorise l'installation d'une infection persistante et d'une inflammation chronique, causes majeures de la morbidité et de la mortalité caractéristiques de la mucoviscidose [338]. Dans la mucoviscidose, une inflammation exacerbée des voies respiratoires a été observée chez les nourrissons, même en absence de pathogènes [107, 339, 340]. L'origine de cette inflammation précoce semble être la conséquence de l'hyper-activation du facteur de transcription NF- κ B et de la rétention de delF508-CFTR dans le RE [149]. Cependant, la correction de la fonction CFTR n'a pas permis la correction du statut inflammatoire, ce qui suggère qu'une autre voie, indépendante de CFTR, serait impliquée dans ce processus.

La réponse inflammatoire dans la mucoviscidose est complexe et implique une multitude de stimuli, tels que le stress oxydatif. La présence de marqueurs du stress oxydatif est souvent associée à cette pathologie. La mitochondrie, grand producteur de ROS, pourrait participer à l'état de stress observé chez les patients. Dans le RE, une activation de la réponse UPR due à l'accumulation de delF508-CFTR a été rapporté. On a également démontré, dans les cellules mucoviscidiques, une diminution de la concentration en GSH et de l'activité de la Cu/Zn-SOD, ce qui peut suggérer l'implication potentielle de métaux comme le cuivre dans la capacité antioxydante de la cellule. Le cuivre est en effet un cofacteur indispensable à l'activité de la Cu/Zn-SOD et se trouve hautement lié par le glutathion (GSH).

Pourtant, la relation entre la fonction de CFTR, l'inflammation et le stress oxydatif dans les cellules bronchiques mucoviscidiques n'est pas encore caractérisée. En particulier, le rôle des métaux comme le cuivre dans la production des ROS et dans l'inflammation est toujours inconnu.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer le rôle de la protéine CFTR dans la production des ROS. Pour cela, nous avons utilisé deux approches. La première consiste dans l'inhibition de l'activité CFTR par l'utilisation de la molécule inh-172, inhibiteur spécifique de l'activité canal chlorure associée au CFTR. La seconde est une surexpression obtenue en utilisant une lignée isogénique de la lignée CFBE : les CFBE-wt.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché l'origine de la source responsable du stress oxydatif observé dans les cellules CF. Pour cela, nous avons étudié des cellules saines et des cellules mucoviscidiques. Nous avons comparé leurs niveaux d'activité pour plusieurs enzymes antioxydants, le niveau de stress des mitochondries et du réticulum endoplasmique et enfin leurs niveaux inflammatoires.

Enfin, comme le cuivre est aussi capable d'induire un stress cellulaire en formant des radicaux hydroxyles (par la réaction de fenton), et de participer à la régulation du stress en partenariat avec la Cu/Zn-SOD ou la GSH, nous avons déterminé la concentration intracellulaire de ce métal ainsi que celle du zinc et du fer. Nous avons également établi le rôle du cuivre dans l'inflammation des lignées étudiées.

Copper Homeostasis and Oxidative Stress in Polarized Cystic Fibrosis

Human Bronchial Epithelia: Role in Inflammation Responses

Amal Kouadri^{1,2,3}, Johanna Cormenier^{1,2,3}, Sylvain Chauvet^{1,2,3}, Laurence Macari^{1,2,3}, Peggy Charbonnier^{1,2,3}, Pierre Richaud⁵, Isabelle Michaud-Soret^{1,2,3}, Nadia Alfaidy^{2,3,4}, and Mohamed Benharouga^{1,2,3}.

¹ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), LCBM-UMR 5249, Grenoble, France.

² Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), DSV-iRTSV, Grenoble, France.

³ Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble 1, France.

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1036, Grenoble, France.

Running Title: Copper in cystic fibrosis human bronchial epithelia.

Address correspondence to:

Dr. Mohamed Benharouga

LCBM-UMR5249

DRF-BIG, CEA-Grenoble

17 rue des Martyrs, F-38054, Grenoble cedex 09, France

Téléphone: (33)-4-38-78-44-51

Fax: (33)-4-38-78-54-87

E-mail: mohamed.benharouga@cea.fr

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is a frequent and lethal autosomal recessive disease caused by mutations in the gene encoding the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR), an apical transmembrane chloride channel.

In CF, initial inflammatory responses have been postulated as key steps in the pathogenesis of the lung disease. Previous studies have also indicated that the CF airway epithelium contributes to the hyper-inflammatory process. However, the causes of such inflammation, particularly bronchial epithelial inflammation, in the absence of any bacterial and/or pro-inflammatory stimulus is not well known. In addition, most of the results regarding epithelial inflammatory responses were obtained using different cells lines, leading to conflicting conclusions, particularly regarding the involvement of CFTR protein in this process. Alterations in the CF lung oxidant/antioxidant status has been proposed as a candidate for triggering early inflammation *via* the activation of the NF κ B system. However, direct evidences are still missing. Using healthy (16HBE14o-; HBE), CF (CFBE14o-; CFBE), and isogenic corrected-wild type CFTR CF (CFBE-wt) cells, we characterized the inflammation and oxidative profiles in relation to the CFTR function and expression.

Measurement of the secretion of, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 (A, E, F) and TNF α showed that CF bronchial cells present an intrinsic inflammation that was not corrected upon a rescue of CFTR function or expression (CFBE-wt). Compared to HBE, CFBE cells showed an alteration in the oxidant (mitochondria and unfolded protein response; UPR) and antioxidant system (Cu/Zn-SOD and Mn-SOD). Only UPR activation was corrected upon CFTR function and expression rescues in CFBE cells.

The most interesting results were the detection of an intracellular stress associated to a significant decrease in copper (Cu) concentrations in CFBE cells. Finally, we showed that oxidative stress and inflammatory responses were tightly associated with copper concentrations in HBE cells.

Altogether, these data highlight new therapeutic tracks in targeting anti-oxidant pathways to reduce oxidative stress and inflammation in CF cells.

Introduction:

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease characterized by viscous mucus¹ and abnormal ion transport across the apical plasma membrane (PM) of the gastrointestinal and the pulmonary epithelia². CF is caused by mutations in the *CFTR* gene that codes for CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) protein, an apical transmembrane cAMP-regulated chloride (Cl⁻) channel^{3,4}. Currently, there are 2023 mutations identified in the *CFTR* gene and classified according to their consequences on the CFTR activity, expression or localization [<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>].

The most common CF mutation corresponds to a deletion of a phenylalanine (F) at position 508 of the CFTR protein (F508del-CFTR). This mutation causes an abnormal conformation to F508del-CFTR leading to its recognition, retention and degradation at the endoplasmic reticulum (ER) compartment⁵. Even if the gating of the channel is affected by the F508 deletion, the mutated protein retains some functionality as a Cl⁻ channel⁶. The absence of a functional CFTR at the plasma membrane dysregulates ions and water flux, leading to dehydrated secretion, thick mucus and reduced clearance of inhaled particles, including bacteria. These dysregulations are associated with persistent infection and chronic inflammation, two major causes of morbimortality in CF population^{1,7}. The CF airway contains large concentrations of several pro-inflammatory mediators including tumornecrosis- α (TNF α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, and IL-17⁸⁻¹⁰. The airway epithelial cells are known to release various inflammatory mediators, which appear to be sensitive to alterations in CFTR function. An activation of the pro-inflammatory nuclear factor- κ B (NF- κ B) has also been reported to be increased in response to CFTR dysfunction¹¹⁻¹⁴. The CF airway epithelium is also characterized by a decrease in the secretion of anti-inflammatory mediators¹⁵⁻¹⁸. Importantly, even in the absence of bacterial or viral pathogens, exacerbated inflammation has been reported in the respiratory tract of CF infants¹⁹⁻²¹. The inflammatory process characterized by the presence of a high density of acute inflammatory cells, such as neutrophils and macrophages^{22,23} and by an excessive CF cells production and secretion of proinflammatory cytokines, such as IL-8 and IL-6²⁴⁻²⁶. The origin of inflammation in CF has been a matter of debate and appears to be the consequence of a hyperactivation of NF- κ B transcription factor and ER retention of CFTR-F508del²⁷. However, CFTR correction in epithelial cells did not allow a return to normal levels of cytokine's secretion, revealing an activated inflammatory intrinsic pathway in CF epithelial cells²⁸⁻³⁰, and rising the question on how a single mutation (delF508) might impact epithelial innate inflammatory response.

The dysregulated inflammatory response in CF is complex, as it involves a multitude of stimuli,

including oxidative stress (OxS). Evidences supporting the occurrence of OxS in cystic fibrosis (CF) is extensive^{31,32}. OxS is defined as a disequilibrium in the pro- and antioxidative balance³³. The prominent of the pro-oxidants responses manifests by an increase in the levels of the reactive oxygen species (ROS) that are generated by oxygen during oxidation reactions³⁴. In CF, ROS levels are increased^{35,36} and participate in the injury of the lung by overwhelming endogenous antioxidant defenses. This causes the release of inflammatory mediators that damage the epithelial cell surface, along with an impairment of bacterial clearance^{37,38}.

The link between CF-associated OxS and CFTR defects has previously been reported³⁹. ER retention of misfolded CFTR-delF508 protein has been associated with the activation of the unfolded protein response (UPR), and ER calcium expansion³⁹. Importantly, CFTR dysfunction has been associated with an innate defect in the metabolism of glutathione (GSH), characterized by a low GSH levels in the bronchial epithelial liquid⁴⁰. Moreover, low activity of copper (Cu) and zinc (Zn) dependent superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), and mitochondrial dysfunctions have been observed in cells with abnormal CFTR expression^{37,41-43}. Altogether, these results indicate that in CF, the bronchial epithelial antioxidant defense system is failing, especially at the enzymatic (Cu/Zn-SOD) and redox system levels (GSH). Importantly, these systems are sensitive to copper homeostasis. This metal acts as an activator for Cu/Zn-SOD and as a natural substrate for the chelation by GSH⁴⁴. Copper is also an important trace element for cellular function. Nevertheless, it becomes toxic when its cellular homeostasis is disrupted. Copper-induced oxidative stress has been documented *in vitro* and *in vivo*⁴⁴, yet the *in vitro* effects of metal-induced oxidative stress have not been studied in bronchial epithelial cells.

The role of copper homeostasis in redox imbalance and inflammatory processes in lung epithelial cells in relationship to CFTR expression and activity is still unknown.

Hence, in the present study, we investigated three major processes in relation to the intracellular redox balance and inflammation in CF bronchial cells, namely i) oxidant and antioxidant statuses; ii) alteration in the inflammation profile, iii) the role of CFTR and copper in redox balance and inflammation.

We demonstrated that CF bronchial epithelial cells exhibit, i) significantly higher levels of ROS and catalase activity, ii) decreased Cu/Zn- and Mn-SOD activity, iii) decreased copper, iron and zinc concentration. Furthermore, we characterized the relationship between inflammation and the OxS, and revealed the role of copper in CF-associated inflammatory processes.

Materiel and Methods

Cell culture

The experiments were performed using human bronchiolar epithelial cell lines: 16HBE14o- (abbreviated as HBE), expressing wild-type CFTR; CFBE41o-derived from a CF patient (abbreviated as CFVE)), homozygous for the $\Delta F508$ mutation ($\Delta F508/\Delta F508$); CFBE-wtCFTR (abbreviated as CFBE-wt), CFBE41o-cells stably transfected with wt-CFTR protein (a generous gift from Dieter Gruenert, University of California at San Francisco, CA). The cells were grown in Eagle's minimal essential medium (MEM) (Thermofisher, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, France) at 37°C under 5% CO₂. The cells were grown in plastic dishes coated with an extracellular matrix containing fibronectin, collagen and bovine serum albumin. Where indicated, cells were treated with vehicle, with different concentrations of copper (Cu), of bathocuproine disulphonate (BCS), a copper chelator, or of CFTR chloride channel inhibitor; CFTRinh-172⁴⁵, for the indicated times.

Measurement of the cAMP-stimulated Iodide Conductance of the Plasma Membrane

The plasma membrane cAMP-dependent halide conductance of BHK cells expressing wt- and mutants CFTR was determined using iodide efflux technique, as previously described⁴⁶. Iodide efflux was initiated by replacing the loading buffer with efflux medium (composed of 136 mM nitrate). The extracellular medium was replaced every minute with the efflux buffer (1 ml). After a steady state was reached, the intracellular cAMP level was raised by agonists (10 μ M forskolin, 0.2 mM CTP-cAMP, and 0.2 mM isobutyl-methyl xanthane) to achieve maximal phosphorylation of the CFTR protein. The collection of the efflux medium resumed for an additional 6–9 min. The amount of iodide in each sample was determined with an iodide-selective electrode (Orion).

Extraction of total RNA and reverse transcription

Total RNA was extracted from the cells according to the manufacturer's protocol (RNAagents; Promega, France). 1 μ g of total RNA was reverse transcribed under conditions recommended by the manufacturer (Agilent technologies).

Quantitative polymerase chain reaction

The level of mRNA of UPR target genes; IRE1, ATF6, PERK and XBP-1 has been assessed using real-time RT-PCR (Biorad, France). The PCR was performed using the primers shown in Table 1 and SYBR green PCR core reagents according to the manufacturer's instructions (Biorad, France). PCR conditions were as described by Alfaidy et al. et al. [Alfaidy, 2013].

The results were normalized to 18S rRNA expression levels. Relative expression was evaluated with $\Delta\Delta$ CT method.

Gene	Primer Sequence 5' → 3'	Size
PERK	FW : TCTG TTCAGCTCTGGGTTGT BW : CCGAAGTTCAAAGTGGCCAA	158 bp
XBP-1	FW: TGTCACCCCTCCAGAACATC BW: AAGGGAGGCTGGTAAGGAAC	196 bp
IRE1	FW: AGCAAGAGGACAGGCTCAAT BW: CATCTGAACTTCGGCATGGG	205 pb
ATF6	FW: GTGTCAGAGAACCAGAGGCT BW: GGTGCCTCCTTTGATTTGCA	166 bp

Table1: Primers used for real-time RT-PCR. FW: Forward, BW: Backward (reverse primer)

Cells lysates

For immunoblot and *ELISA* assays, cells were washed twice with ice-cold phosphate buffer saline (PBS) and lysed at 4°C for 20 min in PBS containing 1% NP40, 0.5% deoxycholic acid, and 0.1% SDS added with protease inhibitors (10 mM PMSF, 1 μM leupetin/pepstatin A and 1mg/ml of iodoacetamide). Protein concentrations were measured using the Micro BCA protein assay kit (Thermo scientific, France).

Electrophoresis and Immunoblotting

Total cell extracts were prepared as described⁴⁷. Protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The blots were probed using monoclonal anti-CFTR antibodies; L12B4 (Millipore, France). Primary antibodies were visualized by horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG and ECL detection Kit (Covalab, France). Immunoblotting of Na⁺/K⁺-ATPase α1-subunit was performed with the mouse monoclonal (α6F, DSHB, University of Iowa) antibodies.

Celle viability using MTT test

Cells were cultured in 96 wells plate upon confluency. Following the treatments, cells were incubated 4h in phenol red free medium containing 10% of MTT ([4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma). The MTT solution was finally replaced by MTT lysis solution (10% Triton X-100 and 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol), and the resulting optical density (DO) was determined after measurement of the difference between 570 nm and 690 nm absorbance.

Intracellular copper determination

To evaluate the intracellular copper concentration, cells were collected and stored at room temperature (RT). Samples were vacuum-dried and mineralized in 70% nitric acid before

Kouadri

analysis with Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) with a Varian, Vista MPX instrument. The copper (Cu), iron (Fe) and zinc (Zn) content were reported relatively to the cells number (nM/10⁶ cells).

ROS Measurements

Cells (10⁶ cells/well) were seeded in a 24-well plate and cultured for 24 h. The cells were washed and changed to serum-free media and incubated with 50 μ M 5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (H₂DCFDA; Thermofisher, France) for 45 min. The conversion of H₂DCFDA to fluorescent DCF was measured using a plate reader Infinite M200 (TECAN, France). Cell lysate was measured at $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ of 495/527 nm using a Berthold

Catalase enzyme activity assays

The catalase activity was determined spectrophotometrically at 240 nm by measuring the decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂) using Beers and Sizer method⁴⁸. Specific enzyme activity (S.A) was expressed as units per mg of protein (abbreviated as S.A).

Cu/Zn- and Mn-Superoxide Dismutase (SOD) Activities

The total SOD activities, including Cu/Zn- and Mn-SOD, was measured according to the method of S. Marklund and G. Marklund based on the inhibition of pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene, C₆H₆O₃) autoxidation⁴⁹. The absorbance was measured at 420 nm for 5 min, and one unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of pyrogallol autoxidation by 50%. To determine only the activity of Mn-SOD, 10 μ L of 54 mM potassium of cyanide (KCN) is added to the reaction.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

The GPx activity was determined according to the method of Flohe and Gunzler⁵⁰. The reaction is based on the reduction of organic hydroperoxides to alcohols by GPx, along with the oxidation of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG). GSSG is then reduced by glutathione reductase (GR) in the presence of NADPH. The GPx activity in the samples is determined by following the decrease in NADPH absorption at 340 nm for 3 min.

Mitochondrial Isolation

Isolation of mitochondria from cell pellets was achieved using a differential centrifugation procedure⁵¹. The pelleted bronchial cells were resuspended in 250 μ l of mitochondrial isolation buffer (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) and homogenized with 15 strokes in a Dounce homogenizer (Fisher Scientific, France) on ice. To obtain mitochondria, the homogenate was subjected to the differential centrifugation procedure described previously⁵¹. Mitochondrial purity and isolation efficiency were assessed by determination of lactate dehydrogenase (LDH) and glutamate dehydrogenase (GDH) activities.

GDH and LDH Activities

To assess mitochondrial fraction contamination by cytosolic components we measured LDH and GDH activities in the mitochondrial and cytosolic fractions⁵². LDH and GDH are enzymes exclusively found in the cytosol and mitochondria, respectively. Before LDH and GDH analyses, the mitochondrial pellets were resuspended in PBS and lysed by the addition of lauryl dimethylamine N-oxide to a final concentration of 0.3% (vol/vol).

LDH activity in both fractions was determined kinetically by monitoring the loss of NADH at 340 nm for 10 min. GDH activity was determined as previously reported⁵³. The assay quantified GDH activity based on the consumption of NADH in the transamination of α -ketoglutarate (oxoglutarate) monitored at 340 nm. Purity and isolation efficiency were expressed as percent of the total activity of LDH and GDH in the samples.

Aconitase and Fumarase Activity Assays

Immediately before aconitase activities were determined, freshly isolated mitochondria were suspended in 0.5 ml of buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 0.6 mM MnCl₂ and sonicated for 2 s. Aconitase activity was measured spectrophotometrically by monitoring the formation of cis-aconitate from added iso-citrate (20 mM) at 240 nm and 25°C. Fumarase activity was determined by measuring the increase in absorbance at 240 nm at 25°C in the reaction mixture to which 30 mM potassium phosphate (pH 7.4), and 0.1 mM L-malate were added. Aconitase and fumarase activities were expressed as units per μ g of protein.

Cytokine secretion by sandwich ELISA

Interleukins (IL) 1 β , IL6, IL8, IL10, IL17 (A, E, F) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) released into the culture media and present in proteins extract were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay kit [R&D Systems]. According to the manufacturer, the sensitivity of this assay system is less than 10 pg/ml.

Statistical analysis

Differences between mean values were compared by Student's unpaired two-tailed *t*-tests using SigmaStat (Jandel Scientific Software, SanRafael, CA). Data are expressed as mean \pm S.E.M, unless otherwise indicated. Significance was set at a two-tailed *P* value of 0.05.

Results

Bronchial epithelial ROS production is independent of CFTR expression and function

CF airway epithelial cells exhibit constitutive oxygen-derived reactive oxygen species (ROS) generation that lead with ROS-derived neutrophils to irreversible lung damage^{54,55}. However, the role of CFTR in bronchial epithelial ROS generation is still not clear. Using the well-characterized transformed healthy (HBE) and CF (CFBE) bronchial epithelial cells, we undertook the evaluation of the role of CFTR in ROS production.

First, we characterized CFTR expression and function in our bronchial epithelial cells model. Using immunoblot assays and anti-CFTR antibodies, we detected CFTR protein in HBE, CFBE and CFBE-wt protein extracts (Fig. 1A). The molecular weight analysis showed the presence of the complex- (black arrow) and the core- (white arrow) glycosylated forms. Our results also confirm the presence of the complex-glycosylated CFTR in CFBE cells resulting from the stably expression of wildtype (wt) CFTR (CFBE-wt) (Fig. 1A). Functional assays confirmed the presence of CFTR at the plasma membrane of HBE and CFBE-wt cells (Fig. B). CFTR Cl⁻ activity, measured using cAMP-activated I efflux was inhibited in both cells lines, in the presence of CFTR-inh-172, a potent and very specific inhibitor of CFTR⁴⁵ (Fig. 1B).

To further analyze the relationship between ROS production, CFTR expression, and CFTR Cl⁻ function, the intracellular ROS variations were monitored. We observed that the intracellular level of ROS was higher (~ two fold) in CFBE cells compared to HBE (Fig.1C). Correction upon expression of wt-CFTR (CFBE-wt) did not significantly attenuate the level of ROS in CFBE cells (Fig. 1C). Also, CFTR Cl⁻ activity inhibition using CFTRinh-172 did not impact ROS levels, neither in HBE nor in CFBE-wt cells, suggesting that CFTR channel's activity is not involved in ROS production (Fig.1D).

Our results showed that ROS levels in CFBE cells is not influenced by the expression or by the activation of CFTR Cl⁻ channel.

These observations also suggest that other sources, independent of CFTR, might participate in the generation of ROS, thus promoting the development of the CF-associated oxidative stress (OxS). To better evaluate the OxS in CFBE compared to HBE and CFBE-wt cells, we assessed various causes of the OxS that have been reported in CF; these included the stress of the ER, the innate defect in the metabolism of mitochondria, the abnormalities in antioxidant enzyme, and inflammation^{37,41,43}.

Antioxidants enzymes activities in the bronchial epithelial cells

First, we measured the activities of the cytosolic superoxide dismutases (SOD) Cu/Zn form (Cu/ZnSOD), and the mitochondrial SOD manganese form (MnSOD). Both enzymes are the

first line of defense against the deleterious effects of reactive oxygen species⁵⁶. Our results demonstrate that at the cellular level, both activities are decreased in CFBE compared to HBE cells (Fig. 2 A and 2B). Interestingly, the stably expression of wt-CFTR in CFBE cells did not correct this defect, suggesting that both activities are independent of the CFTR expression. The superoxide dismutase (SOD) enzymatically scavenges the superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$), converting them to hydrogen peroxide (H_2O_2). The H_2O_2 so produced is removed by the enzymes catalase and glutathione peroxidase (GPx). Thus, we evaluated the activity of catalase and GPx in healthy and CF bronchial epithelial cells.

As reported in figures 2C, the catalase activity is almost two fold higher in CFBE compared to HBE cells, confirming the over-production of CF-associated ROS. However, the catalase activity was not corrected by overexpressing wt-CFTR protein (Fig. 2C). Finally, we did not observe any changes in GPx activity in CFBE cells compared to HBE and CFBE-wt, suggesting a limited role of GPx in CF-associated OxS (Fig. 2D).

In vitro markers of Mitochondria Oxidative Stress

Mitochondria is the primary site of H_2O_2 generation by aerobic metabolism^{56,57}. At the mitochondrial level, the MnSOD is responsible for eliminating H_2O_2 generated by the electron transport chain, therefore protecting the mitochondria from oxidative damage.

As the activity of MnSOD is reduced in CFBE cells (Fig. 2B), we assessed the mitochondrial function in relation to CF disease and CFTR protein.

First, we determined the purity of the mitochondrial fraction prepared from HBE, CFBE and CFBE-wt cells, by measuring LDH and GDH activities, indicators of the cytosol contamination and mitochondrial enrichment⁴³, respectively. In this study, we could recover $\sim 85.7 \pm 2.5\%$ of the total GDH activity detected in HBE, CFBE and CFBE-wt homogenates (Fig. S-1A), the remaining activities were present in the cytosolic fraction. For LDH, only $\sim 5.7 \pm 0.8\%$ of the total activity were detected in the mitochondrial fractions (Fig. S-1B). These results indicate that the mitochondrial fractions are relatively free of cytosolic contamination.

To assess the presence of oxidative stress in the mitochondria we measured the activities of aconitase and fumarase. The activity of aconitase was inactivated by the oxidants. In contrast, fumarase activity was unaffected by such stimuli⁵⁶.

Our results showed that mitochondria from CFBE cells displayed 80% lower aconitase activity compared to HBE cells (Fig. 2E). The loss of aconitase activity in CFBE cells was independent of CFTR expression, since similar loss in CFBE-wt cells was observed (Fig. 2E). Mitochondrial fumarase activities were however comparable between the CFBE, CFBE-wt and control HBE cells (Figure 2F).

These results support the conclusion that CF bronchial epithelial cells have an intrinsic OxS that appears to be independent of CFTR expression and function.

In vitro indicators of endoplasmic reticulum (ER) stress

ER stress and UPR (Unfolded Protein Response) activation have been a focus of interest of several studies, particularly for the calcium homeostasis dysregulation and inflammation pathways activation⁵⁸. Yet the relationship with CFTR expression and ROS production is still unclear. UPR is mediated by the activation of three ER transmembrane stress sensors: IRE1 (inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease-1); PERK (PKR-like ER kinase); and ATF6 (activating transcription factor⁵⁸⁻⁶⁰).

In our study, activation of the UPR was monitored by quantitative PCR (qPCR) analysis. Compared to HBE cells, the levels of the three UPR-associated activation were significantly higher in CFBE cells (Fig. 3A-3D). The levels of expression of PERK (Fig. 3A), XBP-1 (Fig. 3B), IRE1 (Fig. 3C) and ATF6 (Fig. 3D) were ~2.5, ~2.3, ~2 and ~0.5 fold higher in CFBE cells.

These results confirmed the presence of an intrinsic UPR activation in CFBE cells that seems to be independent of exogenous stimuli, such as infection or inflammation. Interestingly, restoring plasma membrane CFTR expression and Cl⁻ secretion corrected the activation defects of UPR, suggesting a relationship between CFTR and UPR function in bronchial epithelial cells.

Inflammatory profile of healthy and cystic fibrosis bronchial epithelial cells

Exaggerated ROS availability detected in CFBE cells (Fig. 1C and 1D) might activate, as was previously reported [92], various signaling pathways involved in the excessive production of pro-inflammatory cytokines in the absence of bacterial infection.

Hence, we analyzed inflammatory profiles of healthy (HBE) and CF (CFBE) bronchial epithelial cells. Using ELISA assays, we evaluated both the production and secretion of different cytokines; IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-10, IL-17 (A,F,E) and TNF α . All these cytokines were reported to be dysregulated in CF, particularly in broncho-alveolar lavage (BAL) fluid from CF patients¹⁶. For HBE cells, except IL-6 and IL-8 cytokines for which the levels of secretion were significantly higher than the production (Fig. 1B and 1C), the others cytokines, IL-1 β , TNF- α , IL-17A and IL-17F showed opposite profiles (Fig. 4A, E, F and G). For these cytokines, the levels of secretion were significantly reduced compared to their production (Fig. 4A, E, F and G). These results suggest that in normal bronchial epithelial cells all tested cytokines are constitutively produced. However, the secretion appears to be constitutive for IL-6 and IL-8, and needs induction for IL-1 β , TNF- α , IL-17A and IL-17F. For IL-17E, no differences were observed between production and secretion (Fig. 4H). IL-10, a potent regulatory cytokine that

decreases inflammatory responses and T-cell stimulation, was not detected in medium, while its production was close to ~63 pg/mg of protein (Fig. 1D).

Compared to HBE, the CF bronchial epithelial cells (CFBE) showed an intrinsic inflammation even in the absence of bacteria, viruses, and fungus infections (Fig. 4A-4H). All tested cytokines showed a significant increase in their level of production (Fig. 4A-4H), except TNF α and IL-10 which showed a significant decrease compared to HBE cells (Fig. 4D, 4E). The levels of secretion were also significantly increased compared to HBE cells for IL-1 β , IL-6, IL-17A, IL17F and IL-17E (Fig. 4A, 4B, 4F, 4G and 4H). Interestingly, despite an increase in the production of IL-8 in CFBE cells, its secretion was significantly decreased (Fig. 4C). For TNF α , a slight decrease in its secretion was observed (Fig. 4E).

IL-8 secretion is associated with CFTR function

The data regarding the involvement of CFTR protein in the control of the inflammatory profile in CF lung epithelial cells is very conflicting and depends on the protocols, conditions of culture and cell type of cells used. We used HBE cells known for their ability to develop a highly polarized cell layer. To evaluate the effect of CFTR inhibition on pro-inflammatory cytokines secretion, HBE cells were treated with CFTRinh-172. First we tested the effect of this drug on the cell viability since CFTRinh-172 was reported to disturb the mitochondrial function in HELA cells. A dose and time dependent treatment have been evaluated and the summary of these results is reported on figure 5A. Compared to untreated HBE cells, treatment with concentration as high as 100 μ M did not affect cell viability, excluding any apoptotic effect of CFTRinh-172 (Fig. 5A).

The inflammatory profile was therefore evaluated in the absence and in the presence of CFTRinh-172 (100 μ M) of. Treatment for 24h did not affect the secretion levels of IL-1 β , IL-6, IL-17F and TNF α (Fig. 5B, 5C, 5E and 5F). However, the secretion of IL-8 was significantly increased from 9.7 ± 0.2 (control) to 13.3 ± 0.4 pg/mg (100 μ M) (Fig. 5D).

Homeostasis of Bio-active trace metals (biometals) are dysregulated in CF bronchial epithelial cells

In addition to UPR and mitochondria dysfunction, intracellular biometals such as zinc (Zn), copper (Cu) and iron (Fe) might participate into ROS production. Reduced metal might undergo a Fenton reaction and form highly toxic hydroxyl radicals (\cdot OH), that induce an OxS⁶¹. To evaluate the intracellular concentration of Cu, Zn and Fe, in HBE, CFBE and CFBE-wt cells we used inductively coupled plasma mass- spectrometry (ICP-MS) analysis. Hepatocyte cell line; HpeG2 was used as a control to validate the measurement. These cells are known to participate in metal detoxification.

Compared to HBE cells, the intracellular concentrations of Cu (Fig. 6A), Fe (Fig. 6B), and Zn (Fig. 6C) were significantly decreased. The introduction of wt-CFTR did not correct the deficiency of these biometals (Fig. 6A-6C), suggesting that other mechanisms and/or other proteins are responsible for the observed CF bronchial epithelial cells dyshomeostasis.

Effect of copper treatment on healthy and CF inflammatory responses

The results reported in figures 2A, 2B and 2E showed a decrease in Cu/Zn- and MnSOD activities and the presence of a mitochondrial dysregulation in CF bronchial epithelial cells.

Moreover, previous data showed a decrease of cytoplasmic and mitochondrial concentration of glutathione, a potent Cu chelatore, in CF lung epithelial cells³⁷. Based on these results, we hypothesized that copper is a biometal with a critical importance in CF, particularly in relationship to OxS and inflammation.

To mimic the decrease in the intracellular copper concentrations observed in CFBE cells (Fig. 6A), we used the specific copper chelator bathocuproine sulphonate (BCS). HBE cells were treated with different BCS concentrations and the levels of intracellular copper concentrations; ROS production, cytokines secretion, and cell viability were evaluated. The results reported in figures S-2 and S-3 did not show any differences compared to the control condition (non-treated HBE cells), suggesting that the chelation of the extracellular copper using BCS did not affect the intracellular copper concentrations, most of which is in a bounded form. The remaining free copper was not sufficient to be detected using the copper probe.

However, the treatment of HBE cells using different copper concentrations did increase the intracellular copper concentration and ROS production (Fig. S-3), indicating that extracellular copper elevation, as was reported in BAL of CF patients⁶², induced OxS that might be the cause of the generated inflammation.

To test this hypothesis, we evaluated the inflammatory responses of HBE cells at the secretory level, in the absence or presence of copper.

For IL-1 β and IL-17 (A, F, E), we did not observe any significant effect upon copper treatment (Fig. 7A, 7E, 7F, 7G). However, significant increase of IL-6 and IL-8 secretion was found following copper treatment (Fig. 7B, 7C), indicating a relationship between inflammatory processes and copper-associated OxS generation in bronchial epithelial cells. Copper did not modify the secretion levels of IL-10, but did increase its production (Fig. 7D). Among well characterized pro-inflammatory cytokines, TNF- α exhibited a significant decreased secretion (Fig. 7H).

Discussion

In this study, we have shown that bronchial epithelial cells homozygous for the delF508 mutation exhibited a constitutive secretion of pro-inflammatory cytokines and an intrinsic oxidative stress response. These two phenomenon were evaluated in the absence of any bacterial infection, a condition that represents the earliest step of cystic fibrosis (CF) development^{37,63}. The cellular model that we used is representative of the bronchial tissue, the first line of defense against the external environment and infections⁶⁴. Unlike other bronchial cell lines, these cells are characterized by their ability to develop a highly polarized cell layer⁶⁵. Despite the fact that the cells used do not originate from primary cultures, they have the advantage to be isogenic for CFBE and CFBE-wt, validating the corrective effect of CFTR-wt. Also, we did not use the Air Liquide Interface (ALI) culture model. This system does not allow collecting media samples from the apical side to assess the levels of secreted cytokines.

In CFBE cells, we confirmed the presence of an oxidative stress by measuring the production of ROS. These results are in agreement with previous reports using different cellular models⁶⁶. In our conditions, neither the expression nor the inhibition of the CFTR activity did affect the levels of ROS production. The statements that CFTR was involved in triggering an oxidative stress were supported by the measurement of ROS in the broncho-alveolar fluid (BAL) of cystic fibrosis patients⁶⁷. These measurements were carried out in a fluid rich in neutrophils, the first producer of ROS, and in virulent bacteria⁶⁷. At the cellular level, the link between oxidative stress and CFTR activity was made indirectly by measuring the glutathione concentration (GSH) and the activity of antioxidant enzymes, such as Cu/Zn-SOD³⁷. Moreover, our results confirmed a decrease in the antioxidant response that was not corrected by the CFTR-wt protein. We have, for the first time, shown that the activity of Mn-SOD, an important enzyme for mitochondrial function, was decreased in CF bronchial cells. This result is in the line with observed decreases in the aconitase activity, an enzyme associated with mitochondrial activity, showing that local production of H₂O₂ is not eliminated by Mn-SOD; this might contribute in a long term in the overproduction of ROS. The correction with the CFTR-wt protein did not modify this activity confirming that the production of ROS by CFBE cells occurs independently of the CFTR protein. Another parameter involved in the production of ROS is the UPR system. The latter has been well described in CF, particularly in relation to calcium homeostasis⁶⁸. However, the link with the CFTR protein was still under debate. Using an isogenic model, we showed that the expression of the CFTR protein (CFBE-wt) corrected this defect and reduced the expression of the UPR actors; PERK, IRE1, XBP1 and ATF6, in CFBE cells.

These results are in line with those published previously, showing that correction of CFTR-delF508 trafficking decreased UPR activation ⁶⁹.

The results of the inflammatory responses showed that despite the absence of infection, CFBE cells secreted pro-inflammatory cytokines. Our results showed that these cells were able to produce IL-8, but could not secrete this cytokine. This lack of secretion has also been observed in other studies using primary culture models, validating the cell model used in this study ¹⁸. The most intriguing result was the loss of the production and secretion of IL-10 by CFBE cells, suggesting that in CF other mechanisms are involved in controlling the inflammatory response. Interestingly, inhibition of CFTR activity in HBE cells did not modify secretion levels of the cytokines. Only IL-8 was increased upon the inhibition of CFTR. This result may be explained by the indirect effect of the inh-172 molecule on the mitochondrial activity observed in HeLa and IB3 cells. Altogether, these results validate the cellular model we used and demonstrate that the generated oxidative stress and inflammation are independent of the CFTR expression. To further characterize the oxidative stress, we evaluated the concentration of three transition metals, copper (Cu), zinc (Zn) and iron (Fe). It is well established that the homeostasis of transition metals is finely regulated and their deregulations is associated with human genetic diseases ⁷⁰.

Using ICPM-MS, we showed strong deregulations in the homeostasis of Cu, Zn and Fe. The decrease in their intracellular concentrations in CFBE compared to HBE cells was not corrected by CFTR-wt. The existence of such deregulations is well documented in the BAL of CF patients ⁷¹. However, the direct effect of these metals on the function of bronchial cells remains to be investigated. The evaluation of the effect of copper on the inflammatory response of HBE cells was further investigated due to its association to several CF-cellular abnormalities ^{72,73}. In addition to elevated Cu in BAL of CF patients, we and other reported a decrease in Cu/Zn-SOD activity [Fig. 2 A, ⁷¹]. We have also shown that the mitochondrial activity, for which copper is the first electron donor, was reduced in CFBE cells. In addition, it is well established that the homeostasis of glutathione, an important cell copper chelator, is deregulated in CF ³⁷. In copper-treated HBE cells, we observed that only the secretion of IL-6 and IL-8 were increased. However, the secretion of TNF α , a potent pro-inflammatory cytokine, was reduced, following copper treatment. For IL-10, an anti-inflammatory cytokine, copper treatment did not affect its secreted levels but it increased its production.

Altogether these results show that cytokines that respond to infectious stimuli are not affected by copper variations, while IL-6 and IL-8, known to respond to oxidative stress ³⁷ are stimulated by this metal. Hence, one can speculate that copper deregulations in CF patients might be causative

of the oxidative stress often observed in this pathology. Nevertheless, it would be interesting to establish a link between NF κ B activation and the cupric status in CFBE cells. Indeed, NF κ B along with AP1 were shown to regulate the transcription of several CF-associated pro-inflammatory cytokines³⁷.

The correlations between copper and inflammation, as well as the correlations between oxidative stress and ROS production, and the impairment of antioxidant defenses, provide evidences that the production of ROS by the CFBE cells might strongly contribute to the activation of the inflammatory process.

Better characterization of the importance of the bio-metals identified in CFBE cells, and the demonstration of their relation to lung diseases, might advance our understanding of the lung micro-environment, especially in lung diseases associated to chronic inflammation.

This work provides new insights into the understanding of the intrinsic inflammatory and oxidative stress responses that are activated at the onset of the CF disease, in the absence of infection and/or pro-inflammatory stimuli, such as TNF α .

References:

1. Boucher, R. C. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1359–1371 (2002).
2. Riordan, J. R. The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 609–630 (1993).
3. Riordan, J. R. & Chang, X. B. CFTR, a channel with the structure of a transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 221–222 (1992).
4. Akabas, M. H. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J. Biol. Chem.* **275**, 3729–3732 (2000).
5. Lukacs, G. L. *et al.* Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart ($\Delta F508$) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* **13**, 6076–6086 (1994).
6. Dalemans, W. *et al.* Altered chloride ion channel kinetics associated with the $\Delta F508$ cystic fibrosis mutation. *Nature* **354**, 526–528 (1991).
7. Heijerman, H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: A short review. *J. Cyst. Fibros.* **4**, 3–5 (2005).
8. Bonfield, T. L. *et al.* Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **13**, 257–261 (1995).
9. Hostoffer, R. W., Krukovets, I. & Berger, M. Enhancement by tumor necrosis factor- α of Fc α receptor expression and IgA-mediated superoxide generation and killing of *Pseudomonas aeruginosa* by polymorphonuclear leukocytes. *J. Infect. Dis.* **170**, 82–87 (1994).
10. Klebanoff, S. J. *et al.* Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **136**, 4220–4225 (1986).
11. Kube, D., Sontich, U., Fletcher, D. & Davis, P. B. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, L493-502 (2001).
12. Weber, A. J., Soong, G., Bryan, R., Saba, S. & Prince, A. Activation of NF- κ B in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl⁻ channel function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **281**, L71-78 (2001).
13. Saadane, A., Soltys, J. & Berger, M. Role of IL-10 deficiency in excessive nuclear factor- κ B activation and lung inflammation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 405–411 (2005).

14. Perez, A. *et al.* CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L383–L395 (2006).
15. Tabary, O. *et al.* 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. Baltim. Md 1950* **164**, 3377–3384 (2000).
16. Bonfield, T. L., Konstan, M. W. & Berger, M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 72–78 (1999).
17. Kammouni, W., Figarella, C., Baeza, N., Marchand, S. & Merten, M. D. Pseudomonas aeruginosa Lipopolysaccharide Induces CF-like Alteration of Protein Secretion by Human Tracheal Gland Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 305–311 (1997).
18. Tabary, O. *et al.* Selective Up-Regulation of Chemokine IL-8 Expression in Cystic Fibrosis Bronchial Gland Cells in Vivo and in Vitro. *Am. J. Pathol.* **153**, 921–930 (1998).
19. Dakin, C. J. *et al.* Inflammation, Infection, and Pulmonary Function in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 904–910 (2002).
20. Khan, T. Z. *et al.* Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 1075–1082 (1995).
21. Muhlebach, M. S., Stewart, P. W., Leigh, M. W. & Noah, T. L. Quantitation of Inflammatory Responses to Bacteria in Young Cystic Fibrosis and Control Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 186–191 (1999).
22. Bergoin, C. *et al.* Cell and cytokine profile in nasal secretions in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **1**, 110–115 (2002).
23. Roum, J. H., Buhl, R., McElvaney, N. G., Borok, Z. & Crystal, R. G. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **75**, 2419–2424 (1993).
24. Escotte, S. *et al.* Fluticasone reduces IL-6 and IL-8 production of cystic fibrosis bronchial epithelial cells via IKK-beta kinase pathway. *Eur. Respir. J.* **21**, 574–581 (2003).
25. Rottner, M., Kunzelmann, C., Mergey, M., Freyssinet, J.-M. & Martinez, M. C. Exaggerated apoptosis and NF- B activation in pancreatic and tracheal cystic fibrosis cells. *FASEB J.* **21**, 2939–2948 (2007).
26. Venkatakrisnan, A. *et al.* Exaggerated Activation of Nuclear Factor- κ B and Altered I κ B- β Processing in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 396–403 (2000).
27. Rottner, M., Freyssinet, J.-M. & Martínez, M. C. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir. Res.* **10**, 23 (2009).
28. Tabary, O. *et al.* Calcium-dependent regulation of NF- κ B activation in cystic fibrosis

- airway epithelial cells. *Cell. Signal.* **18**, 652–660 (2006).
29. Courtney, J. M., Ennis, M. & Elborn, J. S. Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **3**, 223–231 (2004).
 30. Virella-Lowell, I. *et al.* Effects of CFTR, interleukin-10, and *Pseudomonas aeruginosa* on gene expression profiles in a CF bronchial epithelial cell Line. *Mol. Ther.* **10**, 562–573 (2004).
 31. van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Marelich, G. P., Halliwell, B. & Cross, C. E. Oxidative stress in cystic fibrosis: does it occur and does it matter? *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* **38**, 491–513 (1997).
 32. Brown, R. K. & Kelly, F. J. Evidence for Increased oxidative Damage in Patients with Cystic Fibrosis. *Pediatr. Res.* **36**, 487–492 (1994).
 33. Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C. & Chapelle, J. P. [Oxidative stress]. *Rev. Med. Liege* **62**, 628–638 (2007).
 34. Aprioku, J. S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J. Reprod. Infertil.* **14**, 158–172 (2013).
 35. Sadowska-Woda, I., Rachel, M., Pazdan, J., Bieszczad-Bedrejcuk, E. & Pawliszak, K. Nutritional supplement attenuates selected oxidative stress markers in pediatric patients with cystic fibrosis. *Nutr. Res.* **31**, 509–518 (2011).
 36. Laguna, T. A. *et al.* Decreased Total Serum Coenzyme-Q10 Concentrations: A Longitudinal Study in Children with Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* **153**, 402–407.e1 (2008).
 37. Galli, F. *et al.* Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1822**, 690–713 (2012).
 38. Cantin, A. M. *et al.* Antioxidants in cystic fibrosis☆Conclusions from the CF Antioxidant Workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 15–31 (2007).
 39. Ribeiro, C. & Lubamba, B. Role of IRE1 α /XBP-1 in Cystic Fibrosis Airway Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 118 (2017).
 40. Day, B. J., van Heeckeren, A. M., Min, E. & Velsor, L. W. Role for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary *Pseudomonas* infection. *Infect. Immun.* **72**, 2045–2051 (2004).
 41. Back, E. I. *et al.* Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 374–384 (2004).
 42. Tirouvanziam, R. *et al.* High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 4628–4633 (2006).
 43. Velsor, L. W., Kariya, C., Kachadourian, R. & Day, B. J. Mitochondrial oxidative stress

- in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 579–586 (2006).
44. Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K. & Musílek, K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.* **90**, 1–37 (2016).
 45. Ma, T. *et al.* Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin–induced intestinal fluid secretion. *J. Clin. Invest.* **110**, 1651–1658 (2002).
 46. Sharma, M., Benharouga, M., Hu, W. & Lukacs, G. L. Conformational and Temperature-sensitive Stability Defects of the $\Delta F508$ Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Post-endoplasmic Reticulum Compartments. *J. Biol. Chem.* **276**, 8942–8950 (2001).
 47. Benharouga, M., Haardt, M., Kartner, N. & Lukacs, G. L. COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J. Cell Biol.* **153**, 957–970 (2001).
 48. Beers, R. F. & Sizer, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**, 133–140 (1952).
 49. Marklund, S. & Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469–474 (1974).
 50. Flohé, L. & Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114–121 (1984).
 51. Fernández-Vizarra, E. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* **26**, 292–297 (2002).
 52. Andersson, B. S. & Jones, D. P. Use of digitonin fractionation to determine mitochondrial transmembrane ion distribution in cells during anoxia. *Anal. Biochem.* **146**, 164–172 (1985).
 53. Schmidt, E. & Schmidt, F. W. [Methods and value of determination of glutamic acid dehydrogenase activity in the serum. A contribution to the importance of examination of enzyme relations in the serum]. *Klin. Wochenschr.* **40**, 962–969 (1962).
 54. Moskwa, P. *et al.* A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 174–183 (2007).
 55. Boncoeur, E. *et al.* Oxidative stress induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis lung epithelial cells: Potential mechanism for excessive IL-8 expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 432–446 (2008).

56. Ambrosio, G. *et al.* Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J. Biol. Chem.* **268**, 18532–18541 (1993).
57. Guidot, D. M., McCord, J. M., Wright, R. M. & Repine, J. E. Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo. *J. Biol. Chem.* **268**, 26699–26703 (1993).
58. Martino, M. E. B. *et al.* Airway Epithelial Inflammation-induced Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Store Expansion Is Mediated by X-box Binding Protein-1. *J. Biol. Chem.* **284**, 14904–14913 (2009).
59. Martino, M. B. *et al.* The ER stress transducer IRE1 β is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunol.* **6**, 639–654 (2013).
60. Walter, P. & Ron, D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* **334**, 1081–1086 (2011).
61. Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J. & Cuypers, A. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3145–3175 (2012).
62. Smith, D. J., Anderson, G. J., Bell, S. C. & Reid, D. W. Elevated metal concentrations in the CF airway correlate with cellular injury and disease severity. *J. Cyst. Fibros.* **13**, 289–295 (2014).
63. Cantin, A. M., Hartl, D., Konstan, M. W. & Chmiel, J. F. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **14**, 419–430 (2015).
64. Eddens, T. & Kolls, J. K. Host defenses against bacterial lower respiratory tract infection. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 424–430 (2012).
65. Monterisi, S. *et al.* CFTR regulation in human airway epithelial cells requires integrity of the actin cytoskeleton and compartmentalized cAMP and PKA activity. *J. Cell Sci.* **125**, 1106–1117 (2012).
66. Voisin, G. *et al.* Oxidative stress modulates the expression of genes involved in cell survival in F508 cystic fibrosis airway epithelial cells. *Physiol. Genomics* **46**, 634–646 (2014).
67. Starosta, V., Rietschel, E., Paul, K., Baumann, U. & Griese, M. Oxidative Changes of Bronchoalveolar Proteins in Cystic Fibrosis. *Chest* **129**, 431–437 (2006).
68. Ribeiro, C. M. P. & Boucher, R. C. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Cystic Fibrosis-Related Airway Inflammatory Responses. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **7**, 387–394 (2010).

69. Bartoszewski, R. *et al.* Activation of the Unfolded Protein Response by $\Delta F508$ CFTR. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**, 448–457 (2008).
70. Skjørringe, T., Møller, L. B. & Moos, T. Impairment of Interrelated Iron- and Copper Homeostatic Mechanisms in Brain Contributes to the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. *Front. Pharmacol.* **3**, (2012).
71. Bargagli, E. *et al.* Trace metals in fluids lining the respiratory system of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and diffuse lung diseases. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **42**, 39–44 (2017).
72. Percival, S. S., Kauwell, G. P., Bowser, E. & Wagner, M. Altered copper status in adult men with cystic fibrosis. *J. Am. Coll. Nutr.* **18**, 614–619 (1999).
73. Best, K., McCoy, K., Gemma, S. & Disilvestro, R. A. Copper enzyme activities in cystic fibrosis before and after copper supplementation plus or minus zinc. *Metabolism.* **53**, 37–41 (2004).

Legend figures:**Figure 1:** Characterization of CFTR expression and ROS production.

(A) Expression of CFTR protein normalized to Na⁺/K⁺-ATPase in normal (HBE) and cystic fibrosis homozygote for F508del (CFBE) human bronchial epithelial cells. Black arrow correspond to fully glycosylated mature CFTR form (band C). White arrow correspond to core-glycosylated CFTR (band B). (B). Iodide efflux used as a functional assay to determine the activity of CFTR chloride channel in HBE and CFBE cells, in the absence or presence of 10 μM of inh-172, (C) Measurement of ROS concentration in HBE, CFBE and CFBE cells stably transfected with wt-CFTR protein (CFBE-wt) using DCF fluorescent probe. Cells were incubated with 50 μM H₂DCFDA for 45min. The conversion of H₂DCFDA to fluorescent DCF was measured at λ_{ex}/λ_{em} of 495/527 nm. (D) Measurement of ROS concentration in HBE and CFBE-wt in the absence or presence of inh-172 using the DCF fluorescent probe. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls (P < 0.05). Data are expressed as mean ± SE (n=3).

Figure 2: Characterization of the oxidant/antioxidant system in CF bronchial cells.

Catalase, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, glutathione superoxydase (GPx), aconitase and fumarase activities were measured in HBE, CFBE and CFBE-wt cells as described in materiel and methods. (A-B) One unit of the total SOD activity was defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of pyrogallol autoxidation by 50%. The absorbance was measured at 420 nm for 5 min. (C) Catalase activity was determined at 240 nm by measuring the decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂). (D) GPx activity in the samples was determined by monitoring the decrease in NADPH absorption at 340 nm for 3 min. (E) Aconitase activity was measured by monitoring the formation of cis-aconitate upon addition of iso-citrate (20 mM), at 240 nm and 25°C. (F) Fumarase activity was determined by measuring the increase in the absorbance at 240 nm at 25°C. Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls (P < 0.05). Data are expressed as mean ± SE (n=3)

Figure 3: UPR characterization in healthy and CF bronchial cells.

Relative mRNAs expression of PERK (A), XBP1 (B), IRE1 (C) and ATF6 (D) in HBE, CFBE and CFBE-wt cells using real-time RT-qPCR. 18S rRNA expression was used as internal control. Values overwritten with stars are significantly different from each other (P < 0.05).

Figure 4: Evaluation of inflammatory profile in healthy and CF bronchial cells. Measurements of IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-10 (D), TNF α (E), IL-17A (F), IL-17F (G) and IL-17E (H) released in the culture media (grey charts), or present in protein extracts (black charts). The cytokines were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay in HBE and CFBE. Concentrations are in pg/mg of extracted proteins. Values overwritten with different letters (a, b and c) are different from each other ($P < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE (n=6)

Figure 5: Effect of CFTR inhibition on cytokines secretion in HBE cells.

(A) Evaluation of HBE viability using MTT assays following CFTR inhibition using 100 μ M during 24h. For MTT assays, cells were first incubated 4h in phenol red free medium containing 10% of MTT and then the medium was replaced by MTT lysis solution. Cell viability was determined after measurement of the difference between 570 nm and 690 nm absorbance. Measurement of IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-8 (D), IL-17F (E) and TNF α (F) released into the culture media were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay in HBE following treatment with CFTRinh-172. Values overwritten with stars are significantly different from the control ($P < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE (n=6)

Figure 6: ICPM-MS determination of biometals concentrations in healthy and CF bronchial cells.

(A) Copper (Cu), (B) Iron (Fe) and (C) Zinc (Zn) content was assessed in HBE, CFBE, and CFBE-wt cells. For the control, HpeG2, an hepatocyte cell line was used. The content was determined using the inductively coupled plasma mass-spectrometry (ICP-MS) technique. Values overwritten with stars are significantly different from the control ($P < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE (n=3)

Figure 7: Effect of copper treatment on the inflammation profile of healthy and CF bronchial cells.

Measurement of IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-17A (E), IL-17F (F), IL-17E (G) and TNF α (H), released into the culture media (grey chart) and IL-10 (D), present in the protein extracts (black chart) of HBE after treatment with 100 μ M of Cu, during 24h. Cytokine levels were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay in HBE and CFBE. Concentration are in pg/mg of protein extracts. Values overwritten with stars are significantly

different from the control ($P < 0.05$). Data are expressed as mean \pm SE (n=6)

Figure S-1: Determination of LDH and GDH activities in HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

(A) GDH activity was determined by monitored at 340 nm the decrease of NADH concentration during transamination of the α -ketoglutarate (oxoglutarate). (B) LDH activity was determined by monitoring the loss of NADH at 340 nm for 10 min. Data are expressed in % of the control as mean \pm SE (n=6).

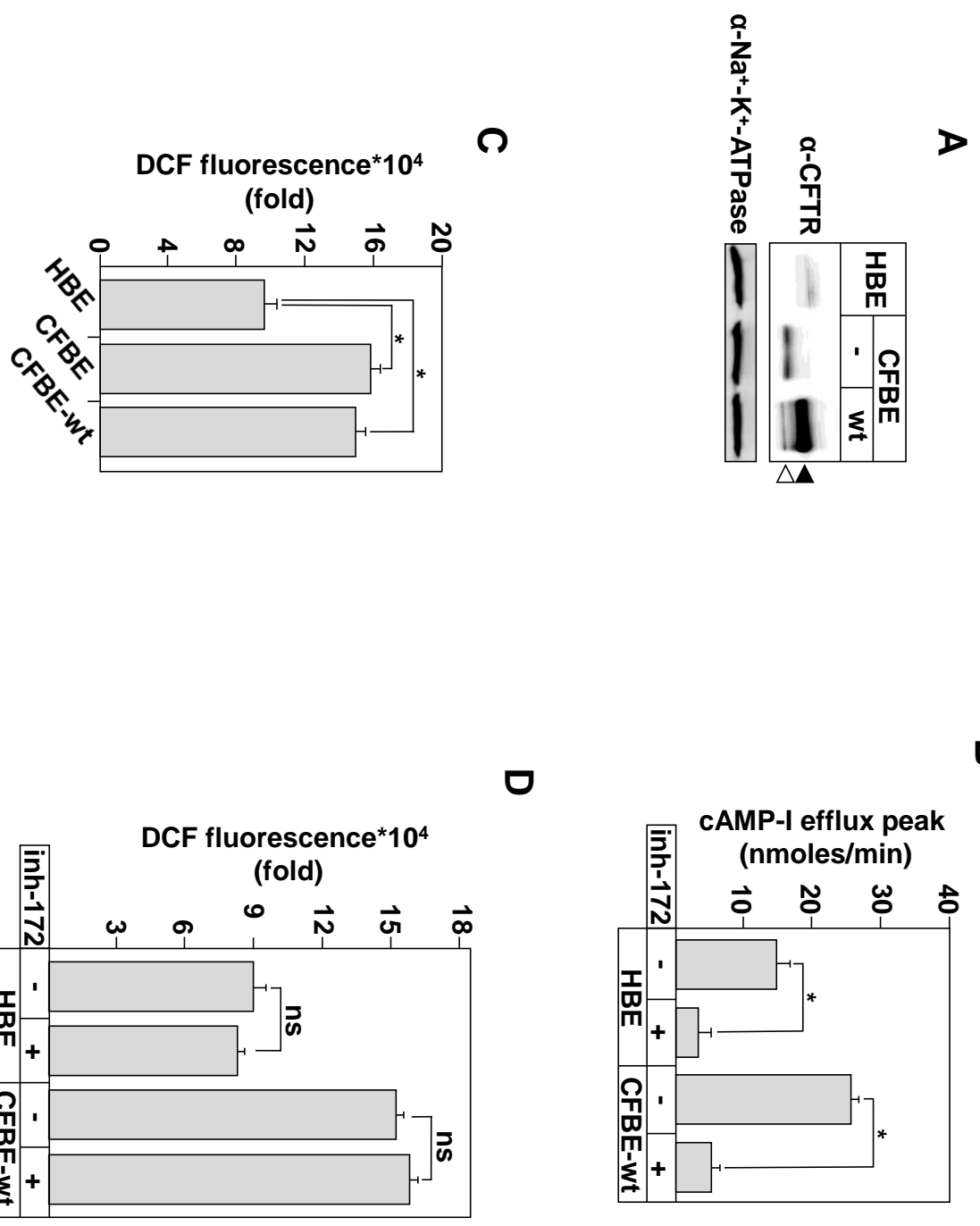
Figure S-2: Effect of BCS treatment on IL-1 β , IL-8, IL-17F and TNF α secretion by HBE cells.

Measurements of IL-1 β (A), IL-8 (B), TNF α (H) and IL-17F (D) released into the culture media (grey chart) of HBE after treatment with different concentration of BCS, a copper chelator, during 24h. Cytokines were assayed using a quantitative sandwich enzyme-linked immunoassay. Data are expressed as mean \pm SE (n=3).

Figure S-3: Evaluation of BCS effect on HBE cells viability, copper content and ROS production.

Determination of cell viability (A), copper content (B) and DCF fluorescence (C) in HBE cells after their treatment with 50 μ M of BCS for 24h. Data are expressed as mean \pm SE (n=3)

Figure 1



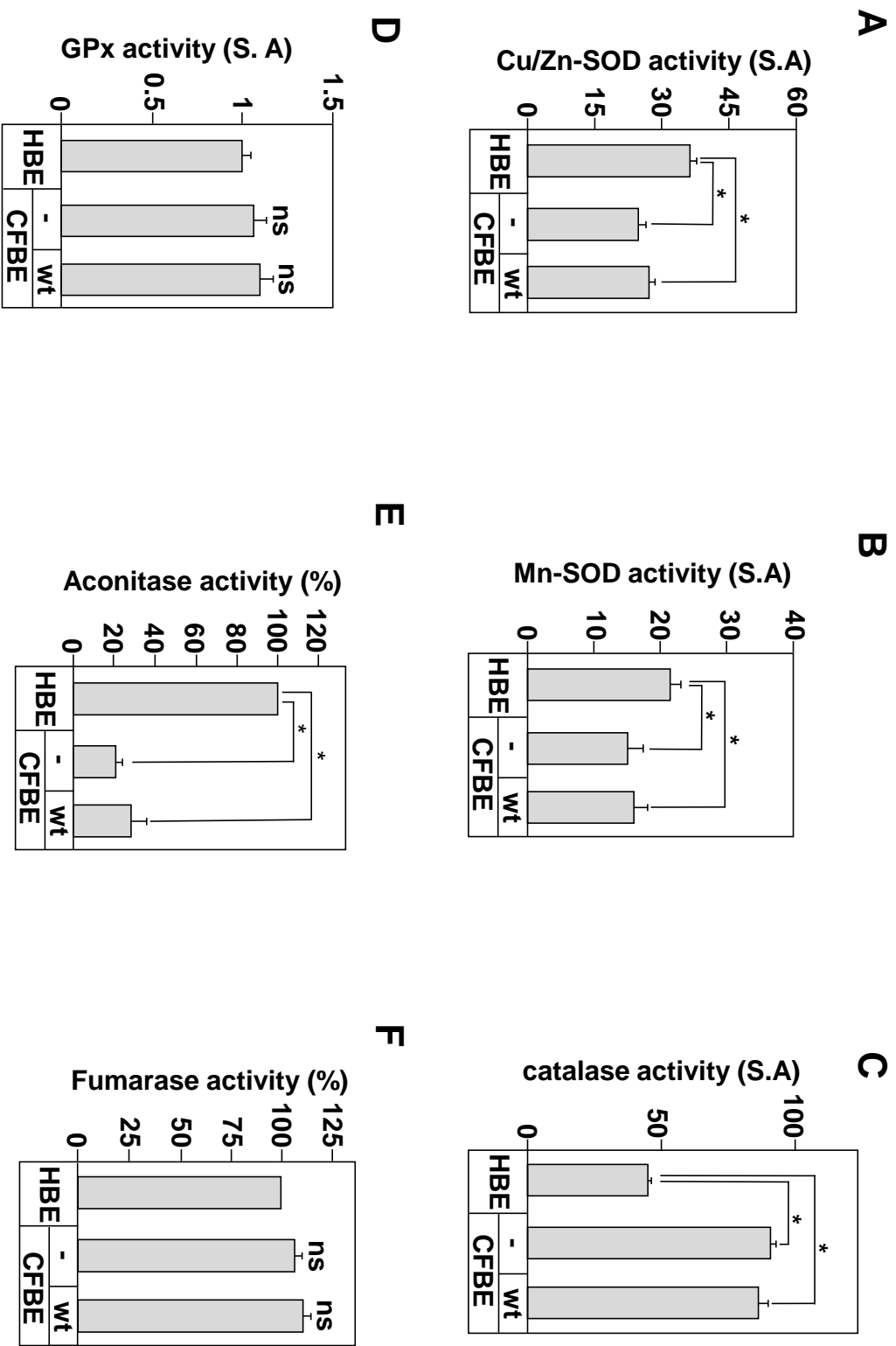


Figure 2

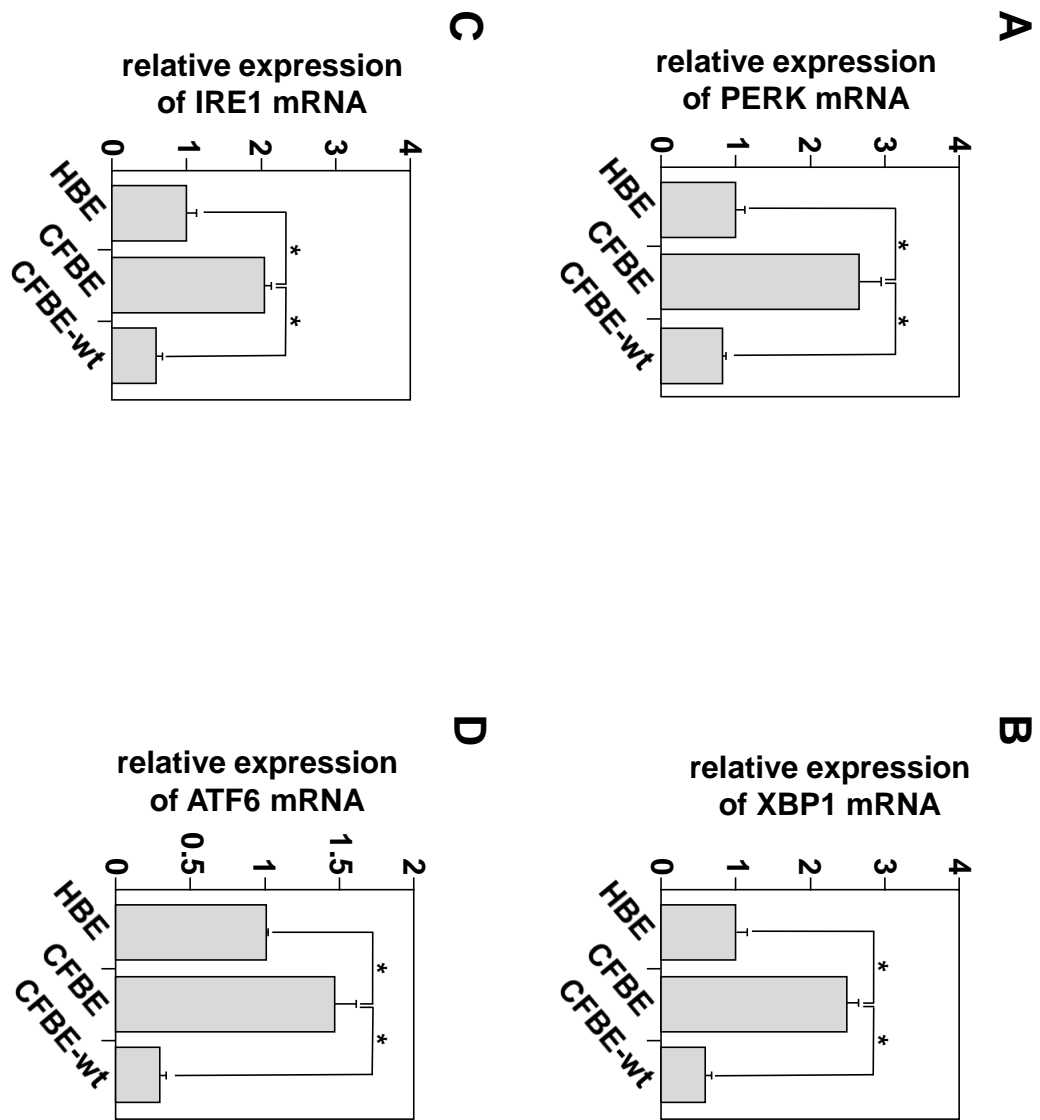


Figure 3

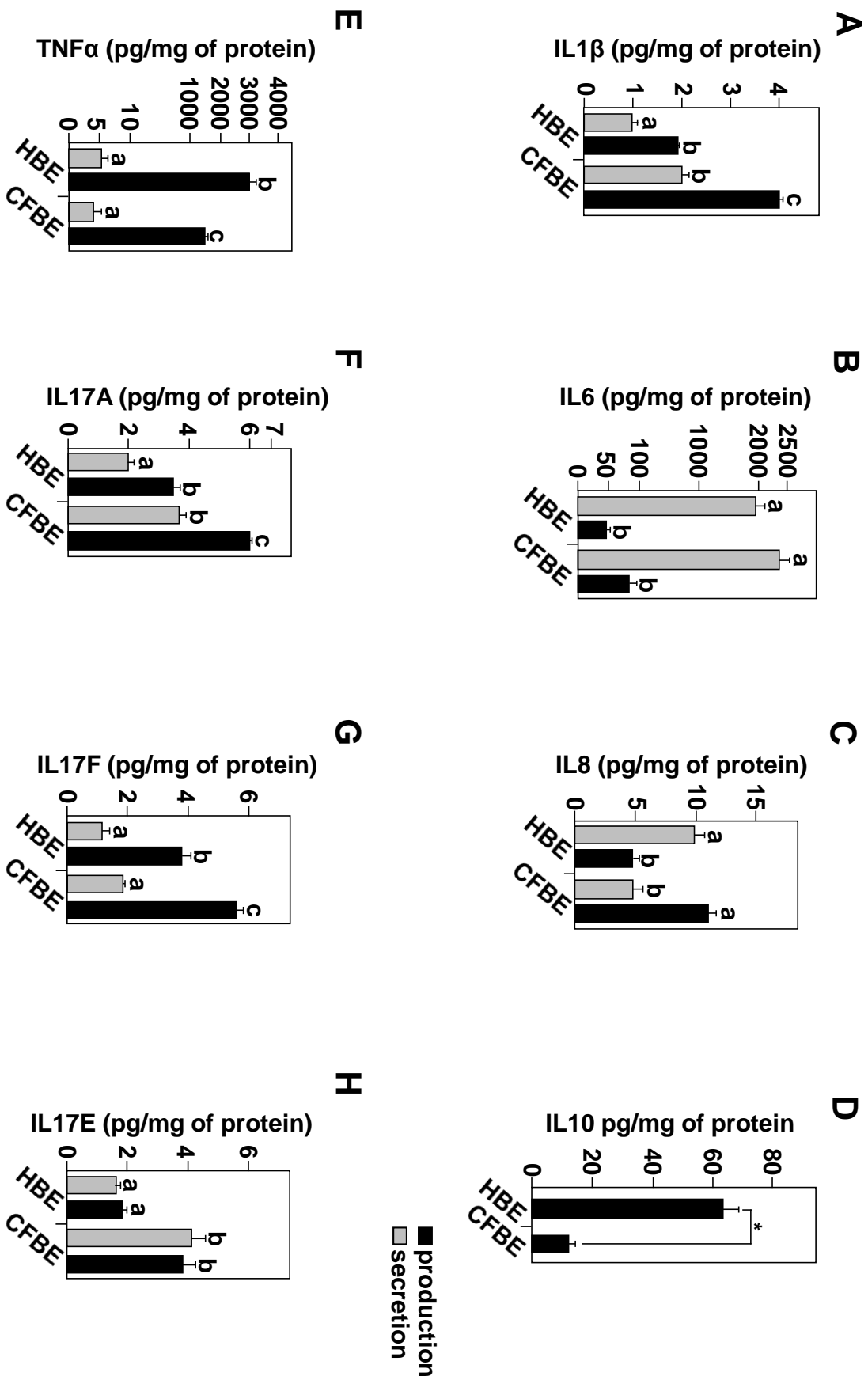
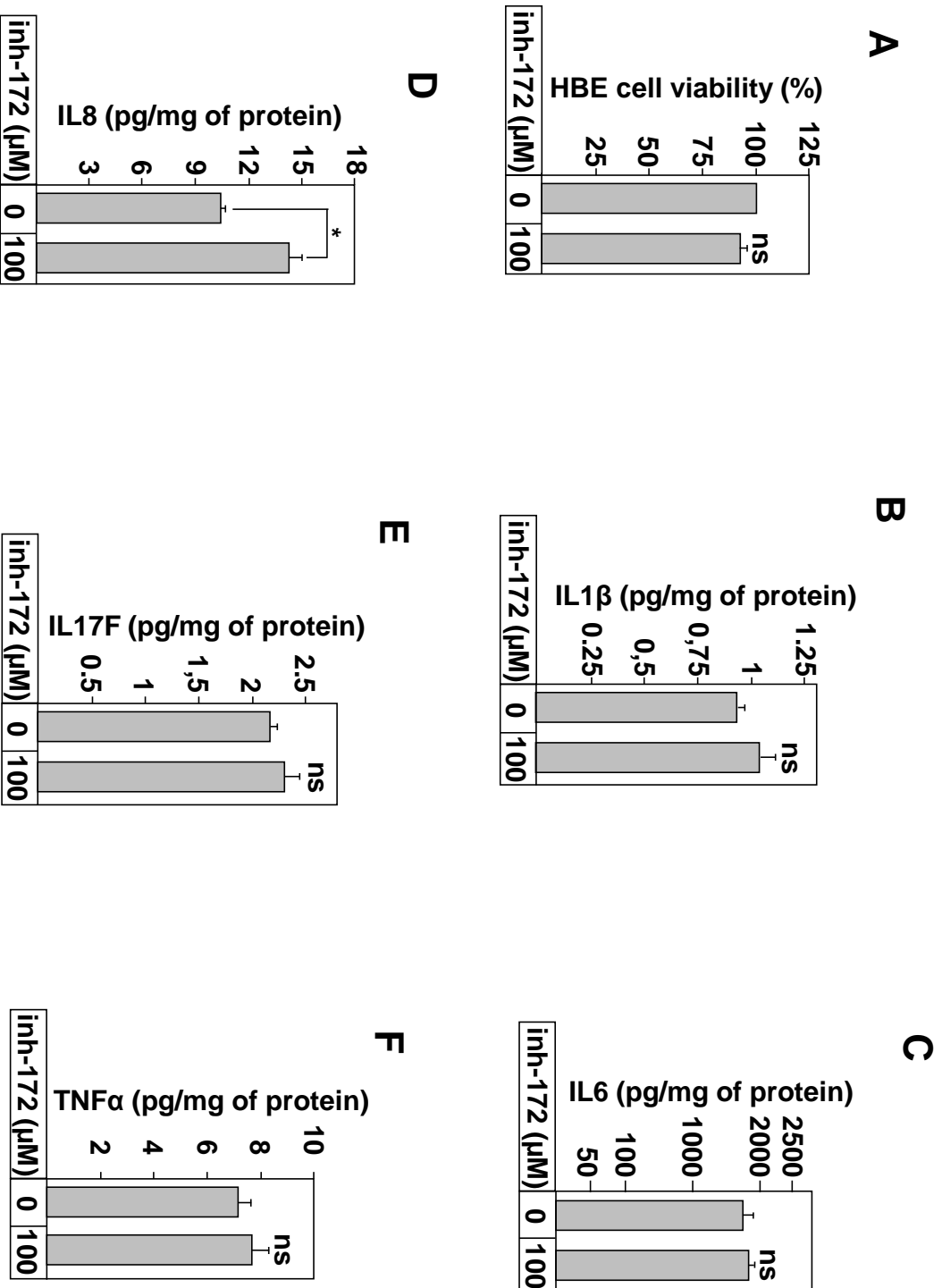


Figure 4

Figure 5



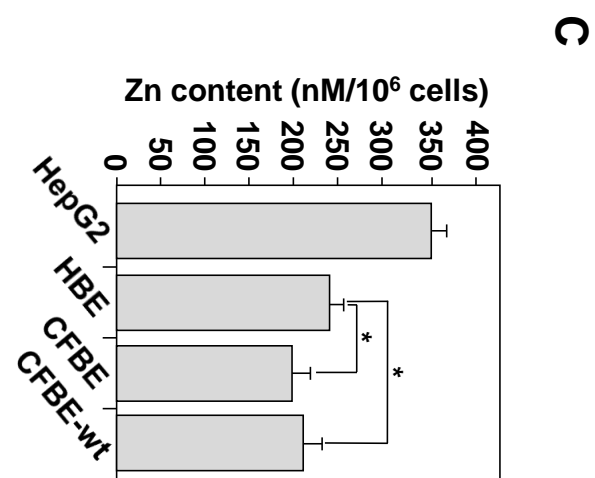
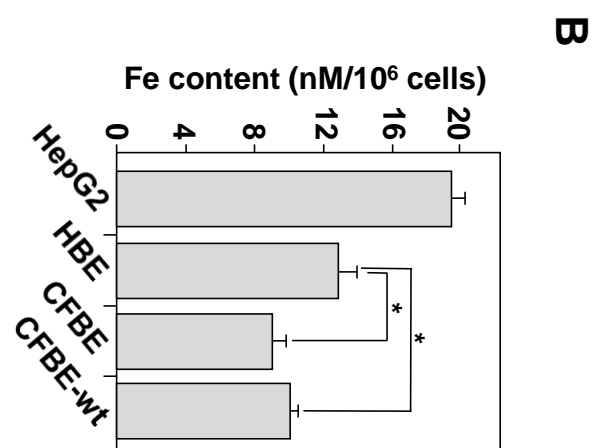
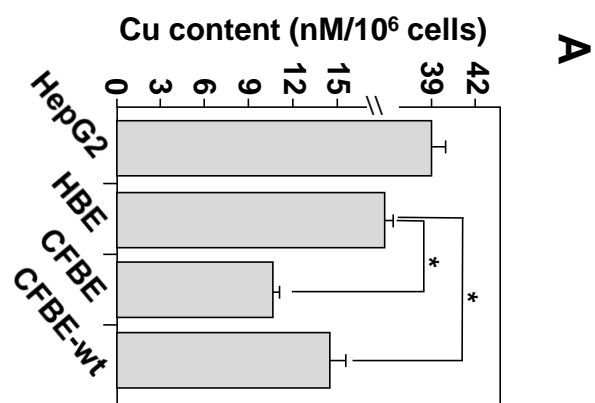


Figure 6

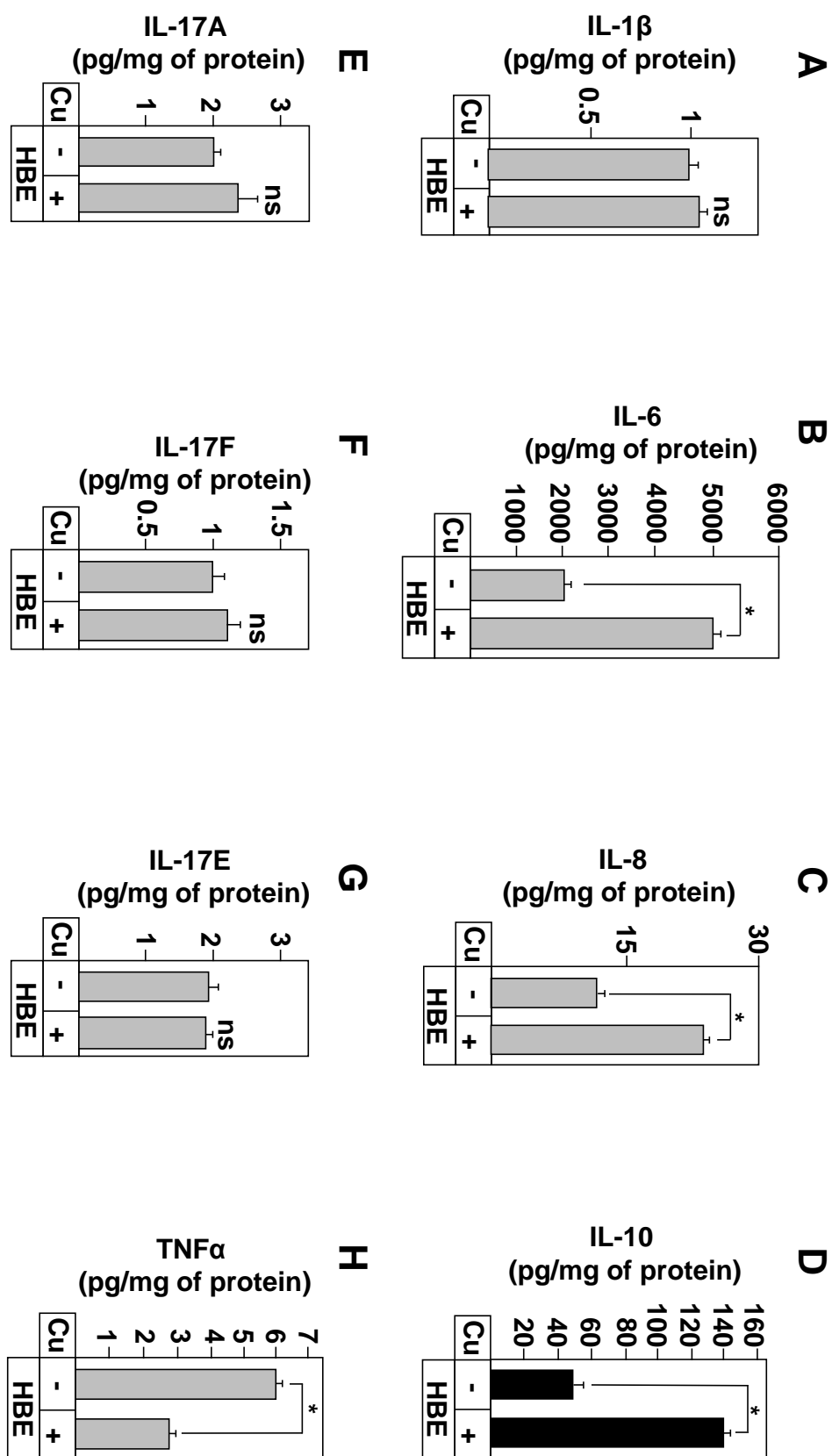


Figure 7

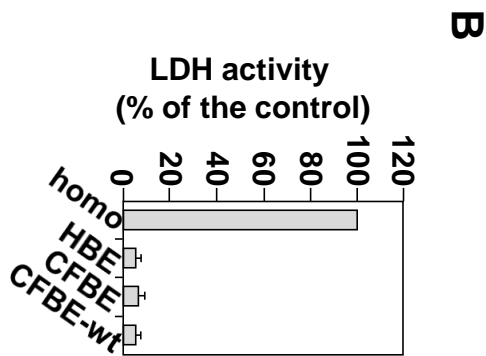
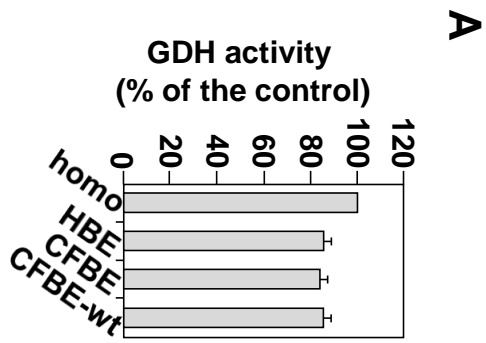


Figure S-1

Figure S-2

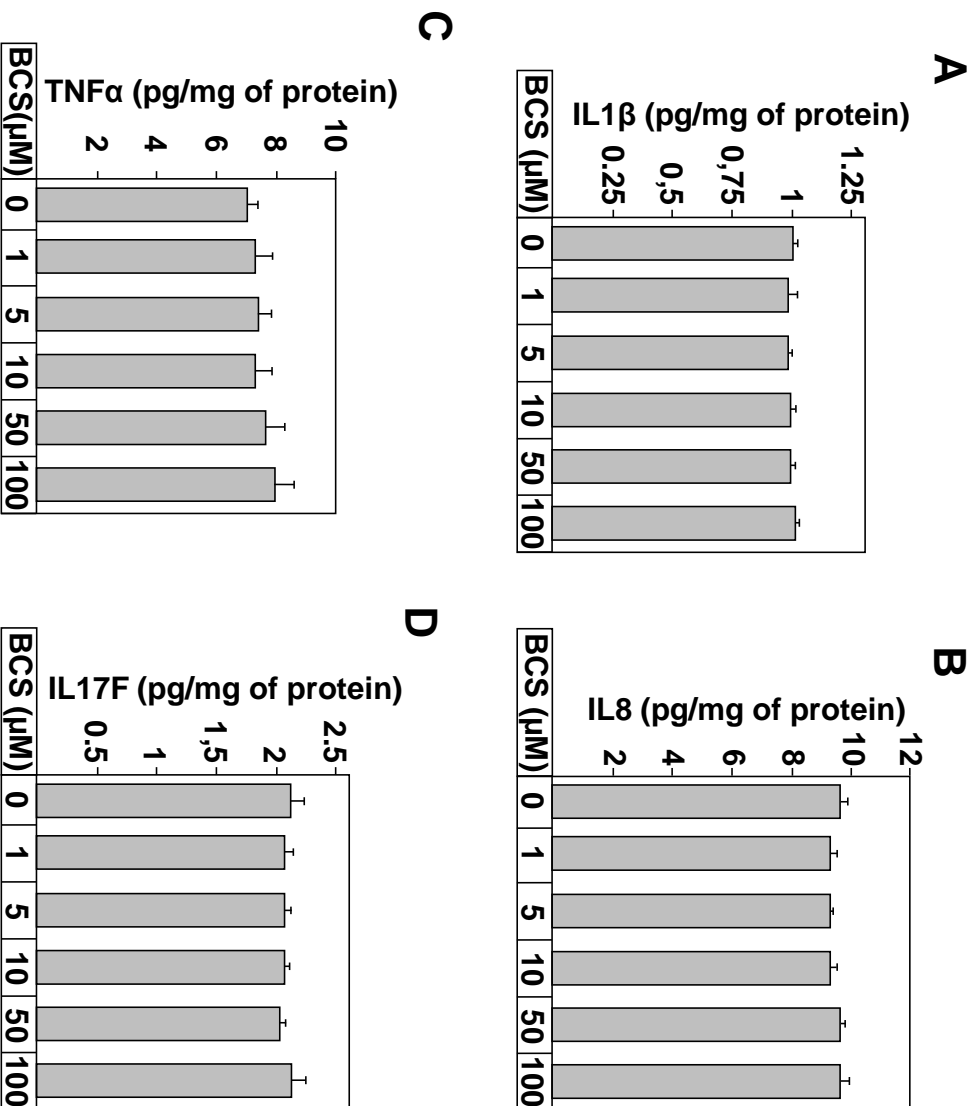
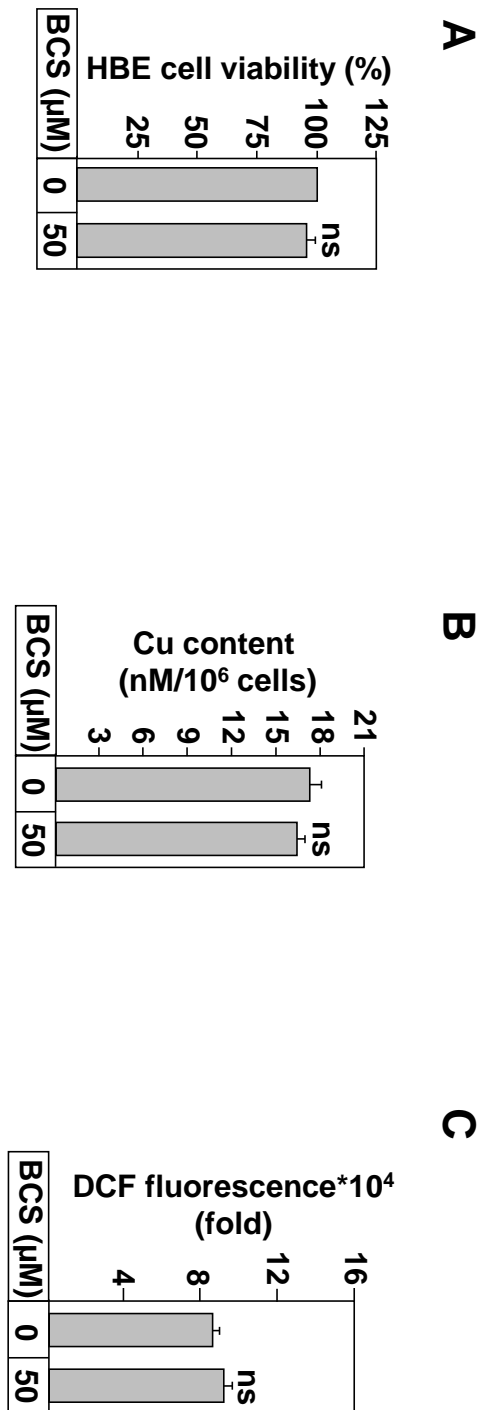


Figure S-3



1.2 Discussion et perspective

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer le rôle de CFTR et du cuivre dans l'inflammation et le stress oxydatif. Dans un premier temps, nous avons cherché le rôle potentiel de la protéine CFTR dans la production de ROS (radical oxygen species), afin de vérifier, si dans la mucoviscidose, le niveau de stress élevé observé chez les patients est lié à un défaut de la protéine CFTR. Nous avons utilisé deux approches différentes : l'inhibition par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de CFTR, le inh-172, et l'expression de CFTR en utilisant la lignée CFBE-wt. Les résultats de ces expériences montrent que le niveau élevé des ROS dans les cellules mucoviscidosiques n'est lié ni à l'expression, ni à la fonction de CFTR, suggérant que d'autres sources indépendantes de CFTR seraient impliquées dans le stress oxydatif associé aux cellules mucoviscidosiques. Parmi les sources possibles, on peut citer les défauts liés à l'activité des enzymes antioxydants, à la fonction mitochondriale, et au réticulum endoplasmique (RE). Afin de déterminer les sources responsables du stress oxydatif observé dans les cellules malades, nous avons comparé l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes, les niveaux du stress mitochondrial et du RE, ainsi que le niveau inflammatoire entre les cellules saines et celles mucoviscidosiques.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes. Comparées aux HBE, les cellules CFBE montrent une forte diminution de l'activité Mn-SOD et Cu/Zn-SOD, une augmentation de l'activité catalase mais pas de variation de l'activité du glutathion superoxydase (GPx). Ces résultats suggèrent que la capacité antioxydante des cellules CF est très diminuée et qu'elle n'est pas en mesure de lutter efficacement contre les ROS.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la fonction mitochondriale dans les trois types cellulaires utilisés (HBE, CFBE et CFBE-wt). De façon intéressante, nous avons constaté la baisse de l'activité aconitase, ce qui indique la présence d'un stress oxydatif mitochondrial. La diminution combinée de l'activité Cu/Zn-SOD et de l'activité aconitase présente un grand intérêt : elle serait due à la diminution de l'un de ses cofacteurs clé : le cuivre et/ou le zinc.

Dans les cellules CF, nous avons observé une diminution des concentrations cytoplasmiques du cuivre qui serait responsable de la diminution de l'activité SOD. Par ailleurs, nous avons étudié l'expression des protéines associées à la réponse UPR, comme PERK, XBP1, IRE1 et ATF6. Ces protéines, indicatrices du stress du RE, montrent une expression très élevée dans les cellules mucoviscidosiques, indiquant la présence

d'un stress UPR dans les cellules CFBE. À l'inverse de l'activité mitochondriale et des activités enzymatiques des protéines antioxydantes associées aux cellules CFBE, le stress identifié dans le RE serait bien dépendant de la protéine CFTR car un retour à la normale a été observé dans les cellules corrigées. Enfin, nous avons comparé le profil inflammatoire de la lignée mucoviscidique à la lignée saine. Pour cela nous avons évalué la production et la sécrétion de plusieurs cytokines dont IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-10, IL-17 (A, F, E) et TNF α . Globalement, la lignée mucoviscidique présentait un profil inflammatoire important, indépendant de CFTR, en comparaison à la lignée saine.

Comme indiqué précédemment, les métaux comme le cuivre sont capables d'induire un stress en formant le radical hydroxyle par la réaction de fenton, et il participe aussi à la régulation du stress en partenariat avec la Cu/Zn-SOD ou la GSH. Ainsi, nous avons déterminé la concentration intracellulaire en cuivre, mais aussi celle en zinc et en fer, ainsi que le rôle du cuivre dans l'inflammation dans les lignées HBE. Les trois éléments étudiés étaient présents en quantité diminuée dans les cellules CFBE, état qui n'est pas corrigé par l'apport de CFTR dans les lignées CFBE. Finalement, nous avons montré que le cuivre était capable d'induire l'inflammation des cellules HBE en augmentant spécifiquement la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8. Notre étude laisse supposer que les cellules mucoviscidiques possèdent un système antioxydant très diminué, une production de ROS très élevée et une importante réponse inflammatoire en absence de toute infection ou stimulation. Ces manifestations ne semblent pas dépendre du CFTR. Cependant, la réponse UPR semble être associée à l'expression du CFTR sauvage. L'élément capable de contrôler à la fois les paramètres en lien avec la balance antioxydants/oxydants, l'activité mitochondriale et la réponse inflammatoire, serait le cuivre. Si la concentration du cuivre est diminuée, comme observé dans les cellules CFBE, il est plausible de penser que la capacité des enzymes antioxydantes baisse au profit d'une augmentation d'un stress mitochondrial, conduisant ainsi à l'augmentation du stress cellulaire et donc au déclenchement de l'inflammation associée aux cellules mucoviscidiques.

Effet de la correction pharmacologique versus la correction génétique sur le profile inflammatoire des cellules épithéliales bronchiques homozygotes pour la mutation delF508

2.1 Introduction

La mucoviscidose est une maladie génétique à transmission autosomique et malheureusement létale. Le gène responsable de la maladie code pour la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*). CFTR est une glycoprotéine transmembranaire exprimée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. La protéine CFTR est un canal chlorure (Cl⁻) dont l'activité est dépendante de la phosphorylation par les protéines kinases A et C (PKA et PKC). En plus de son rôle canal Cl⁻, CFTR régule aussi l'activité d'autres canaux importants dans le maintien de l'équilibre ionique et hydrique nécessaire à la production d'un fin mucus pour la protection des voies aériennes, du système digestif et du système reproducteur [56]. À ce jour, plus de 2000 mutations ont été identifiées sur le gène CFTR et sont groupées en six classes en fonction du défaut moléculaire associé à la protéine CFTR [64]. La plus fréquente des mutations est la delF508 qui correspond à la délétion d'un résidu phénylalanine à la position 508 de la protéine. Cette mutation a pour conséquence le blocage et la dégradation de CFTR au niveau du réticulum endoplasmique par le système ubiquitine/protéasome. Ce défaut serait lié à un mauvais repliement de la protéine au cours de sa synthèse réticulaire. Cependant, la protéine CFTR-delF508 est partiellement fonctionnelle. Les expériences de correction de son adressage vers la membrane plasmique par le biais des chaperonnes chimiques (DMSO, Glycérol et

TMAO) ont montré qu'elles sont capables de restaurer la sécrétion des ions chlorures au niveau de la membrane plasmique [64].

Les mutations du CFTR ont de multiples conséquences ; elles influent principalement sur la qualité du mucus qui devient épais. Ceci entraîne, au niveau pulmonaire, l'obstruction des voies respiratoires favorisant l'infection microbienne, l'inflammation chronique et la destruction progressive du tissu pulmonaire. Ces processus seraient les causes principales de la morbidité et de la mortalité associées à la mucoviscidose [341]. Alors qu'initialement l'inflammation était considérée comme la conséquence de l'infection, de nouvelles études indiquent que ce serait l'inflammation qui précéderait l'infection chez les patients mucoviscidosiques. Cela suggère que l'atténuation de l'inflammation associée à cette pathologie constitue une piste thérapeutique majeure [342]. Aujourd'hui, l'implication de la protéine CFTR dans sa fonction et son expression dans le processus inflammatoire associé à la mucoviscidose sont très discutées. Cependant, il est clair que la cause d'origine de la mucoviscidose est l'absence de sécrétion des ions chlorures. Rétablir cette sécrétion pourrait corriger les manifestations cliniques associées à cette maladie, y compris l'inflammation, et donc envisager des espoirs de guérison.

Deux stratégies thérapeutiques ont été développées. La première est la thérapie génique qui consiste à introduire le gène normal dans les cellules malades afin de rétablir la sécrétion des ions Cl⁻. Les résultats cellulaires ont connu un franc succès. Cependant, lors des essais effectués sur l'animal, les résultats ont été très mitigés. La stratégie a rencontré d'énormes obstacles qui, aujourd'hui, retardent sa mise en place pour l'homme. C'est aussi le cas pour plusieurs autres pathologies génétiques. La deuxième stratégie est la pharmacothérapie. Elle consiste à utiliser des molécules capables de restaurer l'adressage normale de la protéine mutée dans le cas de la mutation delF508 (70 % des cas) et aussi de rétablir la fonction dans le cas de la mutation G551D (5 % des cas), qui ne s'oppose pas à l'adressage et à l'insertion de CFTR au niveau de la membrane plasmique, mais empêche l'ouverture du canal. Récemment, un médicament, Ivacaftor, qui est un potentiateur, a été mis sur le marché pour les patients mucoviscidosiques porteurs de la mutation G551D. Ainsi, dans le cas de la mutation delF508, le travail continue, et la restauration de la sécrétion des ions Cl⁻ par le développement de molécules pharmacologiques est un enjeu majeur pour corriger la mucoviscidose [67]. À ce jour, plusieurs molécules ont été testées et même placées en phase clinique 1 et 2. Certaines molécules ont la capacité de corriger l'adressage ; d'autres visent à corriger l'activité. Néanmoins, l'impact de ces molécules pharmacologiques sur la réponse inflammatoire des cellules bronchiques mucoviscidosiques n'a jamais été évalué. Dans ce travail, nous avons entrepris une

étude *in vitro* descriptive pour comparer les effets de la correction génétique (thérapie génique) à ceux obtenus par la correction pharmacologique ayant des effets sur l'adressage, l'expression ou l'activité de la protéine CFTR-delF508. Les deux méthodes ont été comparées pour leurs effets sur l'atténuation de l'inflammation associée à la pathologie de la mucoviscidose.

Pour déterminer l'effet de la correction génétique, nous avons utilisé des cellules épithéliales bronchiques CF sur-exprimant la protéine CFTR normale (CFBE-wt). À ce jour aucune étude n'a établi le profil inflammatoire de ces cellules. Pour tester l'effet de la correction pharmacologiques, nous avons sélectionné six molécules : le Curcumin (activateur de CFTR qui a eu un grand écho dans les médias car il s'agit d'un constituant du safran) [343], la genistein (puissant activateur de CFTR qui fait partie de la classe des flavonoïdes naturels) [344], le 4-phenylbutyrate de sodium (4-PBA) (appartenant à une classe spéciale d'agents pharmacologiques utilisés dans la restauration des défauts de transport des ions Cl⁻) [345]. Pour ces trois premières molécules, les études *in vivo* ont été plus ou moins abandonnées en raison de l'absence de résultats tangibles et aussi du manque de reproductibilité *in vitro* [346, 347].

Les trois autres molécules donnent des résultats plus prometteurs. La c407 est un correcteur développé par le laboratoire du Dr. A. Edelman. Cette molécule est actuellement sous caractérisation *in vitro* et *in vivo* qui empêche la dégradation de la forme CFTR-delF508 et augmente sa stabilité à la surface de la membrane cellulaire [348]. Le Miglustat, déjà utilisé pour traiter certaines maladies rares, a montré qu'il était capable de restaurer l'activité de la protéine CFTR [226]. La dernière molécule est le Lumacaftor (VX809), un médicament actuellement sur le marché en combinaison avec l'Ivacaftor (VX770) [349].

Toutes ces molécules ont été développées pour corriger le défaut du CFTR. Cependant, leurs effets correcteurs sur l'inflammation associée à la mucoviscidose restent à étudier. Dans un premier temps, nous avons comparé, à la fois au niveau cellulaire et au niveau sécrétoire, les profils inflammatoires des cellules épithéliales bronchiques humaines normales (HBE) et mucoviscidosiques (CFBE), afin de déterminer si ce modèle cellulaire présentait un profil inflammatoire classique comparable à celui décrit chez les patients. Dans un deuxième temps nous avons comparé les profils inflammatoires cellulaires et sécrétoires des cellules épithéliales bronchiques CF surexprimant la protéine CFTR sauvage (CFBE-wt) aux cellules CFBE, afin de déterminer si l'apport de CFTR normale fonctionnelle a un effet direct sur l'inflammation.

Enfin, dans la dernière partie de ce projet, nous avons comparé les profils inflammatoires des cellules CFBE avant et après traitement par les différentes molécules proposées pour corriger le CFTR. Nous avons comparé les résultats obtenus suite à l'utilisation de ces différentes molécules dans les CFBE à ceux obtenus avec les cellules corrigées par l'expression de la protéine CFTR, les CFBE-wt. Cette comparaison nous a permis de conclure à l'efficacité partielle des deux stratégies correctrices dans l'atténuation de l'inflammation associée à la mucoviscidose.

Inflammatory profile of cystic fibrosis bronchial epithelial cells following the recovery of CFTR function: Correctors versus gene expression

Amal Kouadri^{1,2,3}, Sylvain Chauvet^{1,2,3}, Laurence Macari^{1,2,3}, Nadia Alfaidy^{2,3,4}, and Mohamed Benharouga^{1,2,3}.

¹ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), LCBM-UMR 5249, Grenoble, France.

² Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), DSV-iRTSV, Grenoble, France.

³ Université Joseph Fourier (UJF), Grenoble 1, France.

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1036, Grenoble, France.

Running Title: Inflammation in cystic fibrosis human

bronchial epithelia. Address correspondence to:

Dr.

Mohamed

Benharouga

LCBM-

UMR5249

DRF-BIG, CEA-Grenoble

17 rue des Martyrs, F-38054, Grenoble

cedex 09, France Téléphone: (33)-4-38-78-

44-51

Fax: (33)-4-38-78-54-87

E-mail: mohamed.benharouga@cea.fr

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal autosomal recessive disease caused by mutations in the gene encoding the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). The most common mutation of CFTR gene, a deletion of a phenylalanine at position-508 (F508del) causes retention of the functional CFTR-F508del protein in the endoplasmic reticulum.

In CF, failure in the lung function is the most critical manifestation characterized by airway obstruction, infection and inflammation that ultimately lead to fatal tissue destruction. The disease-associated inflammatory process was proposed to be the consequence of bacterial infection. However, recent findings suggest that inflammation can precede infection in CF, comforting the active research towards agents that might attenuate the degree of inflammation. Beside gene therapy, multiple strategies including the use of CFTR-F508del correctors, potentiators and modulators have been tested. Nevertheless, the impact of these drugs has never been investigated on the degree of inflammation in CF bronchial epithelial cells.

Here, we first compared, both at the cellular and secreted levels, the inflammatory profiles of human normal bronchial epithelial cells (HBE) to CF bronchial epithelial cells (CFBE). We have also compared CF bronchial epithelial cells overexpressing wild-type CFTR (CFBE-wt) to CFBE cells. Second, we compared the inflammatory status between CFBE-wt and CFBE cells upon their treatment with established and newly discovered molecules proposed to correct CFTR-deltaF508 trafficking. Our results showed that only Miglustat molecule and gene correction strategy used to restore the plasma membrane Cl⁻ secretion, partially corrected the level of inflammation.

Altogether, our data suggest that defects in CFTR protein might contribute to the disease associated inflammation, but are not the unique cause of this phenomenon. Further studies are mandatory to better decipher the mechanism of CF-associated inflammation.

Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is caused by mutations in CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) that code for the CFTR protein¹, a transmembrane glycoprotein expressed at the apical membrane of epithelial cells. Without any alteration, CFTR functions as a chloride (Cl⁻) channel that transports Cl⁻ ions outside the cell. This secretion contributes to the production of a fine mucus that protects the airway, the digestive and the reproductive systems^{2 3}. For now, more than 2000 mutations were identified. Depending on the type of associated molecular dysfunction on CFTR, these mutations have been divided into six different classes⁴. The most characterized one is the class II mutation found in about 70% of CF patients⁵. This mutation is called F508del and results in the degradation of about 99% of the CFTR protein. CFTR-delF508 never reaches the membrane, causing a defect in the transport of ions and water and an increase in the thickness of the produced mucus. This mucus will obstruct the respiratory tract and the glands, leading to signs and symptoms of CF. A wide range of clinical manifestations can be observed from one patient to another. This include the onset of early symptoms or the severity of disease progression. Nevertheless, a decline in the pulmonary function characterized by a progressive infection of the respiratory tract and a chronic inflammation are the main causes of mortality⁶. In cystic fibrosis (CF), inflammation is detected early on in the airways, even before the onset of bacterial infection, suggesting that mechanisms other than infection are at the origin of the initial inflammatory process⁷. Inflammation is beneficial but can be dangerous and in some cases mortal. The assumption so far, is that a dysfunction of the CFTR protein is involved in a poor regulation of the inflammatory mechanisms^{8,9}. Hence, CFTR correction was proposed as the key to the improvement of inflammation in CF patients. To this end, multiple studies were carried out to restore the activity of CFTR, either directly through genetic correction^{10–13}, or indirectly through the use of molecules with potential corrections of the CFTR trafficking and activity^{14–18}. These molecules include the Miglustat (Zavesca), an approved drug that corrects F508del-CFTR activity^{19–21}. Importantly, this molecule was shown to exhibit an anti-inflammatory effect, independently of CFTR correction in bronchial cells. Also, this molecule was capable of inhibiting the pro-inflammatory signaling upon *P. aeruginosa* infection²². Except for this study, no other studies have been conducted to determine the effect of CFTR correction on the regulation of CF-associated inflammation. Since the discovery of CFTR, important

progresses were achieved in the medical care. Nevertheless, life expectancy is still about fifty years for CF patients. To date, two basic therapeutic approaches are proposed. The first one targets microbial infection and the second one targets the origins of the disease. Therapies targeting the root that causes the disease are most desirable, though they are challenging to develop.

In this study we have selected six molecules to be tested. Curcumin, as an activator of CFTR. This molecule had a great rebound in the media, because it is a constituent of turmeric, that is consumed in large quantities worldwide and because it is cheap²³. Genistein, a potent activator of the CFTR channel, also part of the class of natural flavonoids and a powerful inhibitor of the tyrosine kinase activity of EGF receptor, was also proposed²⁴. Sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA), is a special class of pharmacological agents used in the restoration of chloride transport defects²⁵. These three molecules were more or less abandoned, because of the absence of concluding results *in vivo*, or because of the lack of reproducibility *in vitro*^{26–28}. The fourth one is a corrector developed by Dr. A. Edelman, the C407 molecule. This molecule is currently under *in vitro* and *in vivo* characterization²⁹. The C407 is known to prevent the degradation of CFTR-F508del form and to increase its stability at the surface of the cell membrane. The Miglustat, used to treat rare diseases can restore the activity of the CFTR protein²⁰. This molecule is actually in Phase 2 clinical trial for CF patients. The last one is the Lumacaftor (VX809), a drug currently on the market³⁰. All these molecules were developed to correct CFTR, but there is no study on their effect on CF associated inflammation.

Because defective CFTR protein is the cause of the disease, the correction of its activity seems to be the unique loophole. This can either be achieved by the restoration of the chloride secretion activity, using pharmacological molecules or by gene therapy.

It is also believed that treatments that combine both pharmaceutical options and gene therapy could be successful for CF treatment. Yet, none of such studies have been conducted to test their combined effects on the inflammation aspects, which are responsible of the death of most patients.

Here we conducted an *in vitro* study in which effects of established molecules to treat CF as well as gene therapy taught to correct the disease were compared for their effects on the inflammatory status of the CF disease.

Experimental Procedures

Cell Culture

Cell lines 16HBE14o- (HBE) ³¹, CFBE41o- (CFBE) equivalent of HBE cells homozygote for CFTR F508del mutation, CFBE over-expressing F508del (CFBE Δ F) or over expressing wild-type CFTR (CFBE-wt) and BHK-21 overexpressing wild-type CFTR (BHK-wt) were used in this study.

HBE and CFBE cells were cultured at 37°C in a 5% CO₂/air atmosphere in normal MEM (Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich). CFBE-wt and CFBE- Δ F were cultured in normal MEM supplemented with 2 μ M of puromycin. BHK-wt cells were cultured with high glucose DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich). All media were supplemented with 10% fetal Bovine serum (Biowest, France) and 5 μ M plasmocin to avoid mycoplasma infection.

For CFTR correction, cells were treated for 24h with 10 μ M of Sodium phenylbutyrate (4-PBA), VX809 (Lumacaftor), curcumin, miglustat, genistein or C407 (alexander et al).

Cells lysates

All supernatants were kept for ELISA test.

Cells were washed twice with ice-cold phosphate buffer saline (PBS, Sigma Aldrich) and lysed at 4°C for 20 min in PBS containing 1% Tween added with protease inhibitors (10mM PMSF, 1 μ M leupetin/pepstatin A and 1mg/ml of iodoacetamide). Protein concentrations were measured using the Micro BCA protein assay kit (Thermo scientific).

Electrophoresis and immunoblotting

All protein samples were in 1X final concentration of Laemelli Sample Buffer (LSB 5X: 60mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% β -Mercaptoethanol, 0.01% Bromophenol Blue), Subjected to a SDS-PAGE (6% migration gel), transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and probed with corresponding primary antibodies. The membranes were then probed with a secondary antibody coupled to HRP (Covalab) and the reaction was revealed using ECL (Bio-Rad) in Fusion FX7 (Vilbert Lourmat).

Iodide efflux measurement

Cells were washed twice with ice-cold PBS and incubated 1h with load buffer (136mM NaI, 3mM KNO₃, 2mM Ca (NO₃)₂, 20mM HEPES and 11mM glucose at pH 7.4). Cells were then washed multiple times and incubated for 8 min with efflux buffer (136mM NaNO₃, 3mM KNO₃, 2mM Ca(NO₃)₂, 20mM HEPES and 11mM glucose at pH7.4). Every minute during those 8 min withdraw some supernatant. At the 4 min, activation buffer was added (136mM NaNO₃, 3mM KNO₃, 2mM Ca(NO₃)₂, 20mM HEPES, 11mM glucose, 20 μ M Forskoline and 200 μ M IBMX at

pH7.4). The concentration of I^- ions was measured with an iodide electrode.

ELISA test

The inflammatory cytokines; IL1 β , IL8, IL6, TNF α , IL17A/F/E and IL10, were assessed. ELISA test were performed following the PeproTech protocol (Ref 900-K18, 900-K16, 900- K21, 900-K25, 900-K277, 900-K234, 900-K95 and 900-K84).

Statistical analysis

Differences between mean values were compared by Student's unpaired two-tailed *t*-tests using SigmaStat (Jandel Scientific Software, SanRafael, CA). Data are expressed as mean \pm S.E.M, unless otherwise indicated. Significance was set at a two-tailed *P* value of 0.05.

Results

CFTR expression in CFBE cells was too low to validate the use of these cells in the study that aimed at correcting CFTR function (Figure 1A). Hence, we used HBE, a cell line that is extensively used as a model for cystic fibrosis^{32–34}, CFBE-WT and CFBE overexpressing delta F508 mutation for the rest of the study. BHK cells were only used to compare basal levels of CFTR protein in normal and CFBE cells (Figure 1A). Compared to CFBE, CFBE- WT exhibited significant increase in the Iodine efflux comforting the use of these cells as positive controls (Figure 1B). Figure 1C reports the effects of the treatment of CFBE-delta with different correctors. There was an increase of the stable CFTR protein comforting the investigation of their potential effects on the inflammatory status.

CFBE cells are inflamed and are unable to secrete certain cytokines

Even if several studies have shown that cystic fibrosis patients present an abnormal inflammatory profile in the absence of any infection^{7,35}, no complete comparative profiles of the inflammatory status was performed between HBE and CFBE cell lines.

First, we compared intracellular inflammatory profiles of HBE and CFBE cells. There was an increase in the production of IL6, IL8, IL1 β , IL17A and IL17E and a decrease in TNF α and in the anti-inflammatory cytokine IL10 in CFBE cells compared to HBE cells (Figure 2). These data confirm the increased inflammation observed in CF patients, in the absence of any infection⁷.

Second, we compared the levels of secreted cytokines in the conditioned media in HBE and CFBE cells. There was an increase in IL17A, and IL6 secretion substantiating their increased production in CFBE cells. While, TNF α and IL β production was increased in CFBE cells, there was no changes in their secretion in CFBE compared to HBE cells. In contrast, IL8 secretion was even decreased, while it was overexpressed by CFBE cells (Figure 3). Neither in HBE nor in CFBE we did detect IL10 in the conditioned media.

Does wt-CFTR overexpression in CFBE cells corrects their inflammatory profiles?

Because we hypothesized that the CF-associated genetic defect might contribute to the early inflammatory process observed in this disease, we compared the inflammatory profiles of CFBE and CFBE-wt cells that have been corrected for the CFTR chloride channel's activity, allowing the recovery of the normal apical secretion of the Cl⁻ ions.

When comparing CFBE and CFBE-wt intracellular inflammatory profiles, we observed a correction only for two pro-inflammatory cytokines TNF α and IL1 β . A minor correction for IL6 was observed in CFBE-wt. Nevertheless, IL6 levels upon correction did not reach the levels measured in HBE cells. This was also the case for IL10 which production even exceeded the

one observed in HBE cells. No change was observed for IL17A.

IL17E and IL8 were even more produced in CFBE-wt compared to CFBE cells (Figure 4). When comparing the secreted cytokines between CFBE and CFBE-wt, we did not observe any correction for the cytokines measured. IL8 secretion was not restored; even if its production was increased in CFBE-wt. IL6 secreted levels were even decreased in CFBE-wt compared to CFBE and HBE. (Figure 5).

Overall these results demonstrate that the genetic expression of wild type CFTR partially corrected the levels of inflammatory cytokines. Only TNF α and IL1 β production were significantly corrected.

Correctors and inflammatory responses

Because cell therapy using normal CFTR gene did not show significant ameliorations of the inflammatory profile of CFBE cells, we investigated the direct effects of molecules known to activate and/or correct the CFTR function. These included the CFTR activator, the Curcumin²³; the correctors VX809³⁰, a molecule currently used in CF patients; the Miglustat²⁰, a molecule currently on clinical trial; the C407, a molecule provided by Edelman's team. The C407 is currently under characterization and was shown to be more efficient in *in vivo* systems²⁹. Also, we used two molecules that were reported to have direct and significant effects on CFTR *in vitro* but were abandoned because of the lack of any effect *in vivo* (4-PBA and Genistein)^{24,25}.

Figure 6 reports comparisons of the effects of all molecules on different cytokines. The VX809 was the only molecule that did not have much effects on CFBE cells, either at the production or secretory level.

In the media VX809 increased IL17E, IL17F, TNF α and IL1 β secretion and decreased IL6 and IL17A when compared to CFBE cells and increased IL8 secretion, but not sufficiently to correct its levels (Figure 6B).

The intracellular inflammatory profile was also affected upon VX809 treatment. There was a decrease in IL8, IL17A and IL17F, an increase in TNF α , IL10 and IL6 and no effect was observed on IL17E and IL1 β . (Figure 6A).

Genistein and Curcumin had little effects on the inflammatory status. At the production level, Genistein had no effect on IL17E. Decreased IL17A and IL8 and increased IL10, IL6, IL1 β and TNF α were observed. (Figure 6A). No correction of the inflammatory profile was observed at the intracellular level. At the secretory level, Genistein corrected IL6 and IL17A. It increased IL8, IL17E, IL17F, TNF α and IL1 β secretion (Figure 6B).

For Curcumin only IL8 production was corrected. No effect was observed on IL1 β , IL17F and IL17E. There was a significant increase in IL6, IL10 and TNF α production and a decrease in

IL17A (Figure 6A). At the secretory level, no correction was observed.

Curcumin induced an increase in IL8, IL6, TNF α , IL1 β , IL17E and IL17F levels, and decreased IL17A secretion (Figure 6B).

4-PBA and C407 had more inflammatory correction effects. 4-PBA corrected IL8 and IL17A production had no effect on IL17F, IL17E and IL1 β and increased IL6, IL10 and TNF α (Figure 6A). There was no correction on the secreted cytokines. 4-PBA increased IL17F, TNF α , IL1 β and IL8 secretion, and decreased IL6 and IL17A but not sufficiently to meet their normal levels (Figure 6B).

C407 corrected IL8 and IL17E secretion, but did not have any effect on IL17A. It increased IL17F, TNF α and IL1 β secretion and decreased IL6 (Figure 6B). There was no correction of C407 at the production level. No effect was observed on IL17A, IL17E and TNF α levels. C407 excessively increased IL1 β and IL10 production, and decreased IL6 and IL8, but not sufficiently to meet their normal levels (Figure 6A).

The unique CFTR corrector that exhibited the best inflammatory correction at the production and secretory levels was Miglustat. Both TNF α and IL17A secretion were corrected upon Miglustat treatment. Increased levels of IL1 β and IL17F were observed along with a reduction in IL6 and IL17F (Figure 6B). For the intracellular inflammatory profile, Miglustat corrected IL6, IL8 and IL17A production, had no effect on IL17E, decreased IL1 β and increased TNF α and IL17F. However, these effects were not sufficient to correct the full profile.

Miglustat also induced an increase of IL10 production. Its levels were still higher compared to the levels observed in HBE cells, but were less high compared to the other correctors (Figure 6A).

Overall our results demonstrate that both strategies used to correct CFTR expression and or its activation did not achieve full correction of the CF-associated inflammatory profiles.

Nevertheless, some correctors did show significant changes in the levels of specific cytokines.

Discussion

In this study we first demonstrated that CFBE cells exhibited higher inflammatory status compared to HBE cells. This finding was in line with previous reports considering CF patients^{36,37}. CFBE cells produced more IL6, IL8, IL17A, IL17E and IL 1 β . This elevated production was in mirror with the reduction in the production of the anti-inflammatory cytokine, IL10 and in the key regulator of the inflammatory responses, the TNF α . While IL6 and IL17A production was correlated to their secretion, this was not the case for IL8, as its secretion was even decreased compared to its production. These results suggest that the regulated cytokines do not exhibit the same processing in CFBE cells and that CFTR protein's activity might influence IL8 secretion. The same result was previously reported for this cytokine, substantiating the potential direct involvement of CFTR protein in IL8 secretion³⁸.

Experiments using CFBE-wt cells did not allow significant conclusions in regards to the corrections of the inflammatory status upon the correction of the CFTR channel's activity. Except the correction of TNF α and IL1 β , and the diminution of IL6 secretion, the other cytokines were not changed. Hence, even if TNF α was fully corrected, there were still important deregulations in the inflammatory status in these cells. The partial correction of the level of inflammation in the CFTR corrected activity condition, suggests that the genetic correction of CFTR is not sufficient to abolish the deregulations in the inflammatory status. These findings suggest that CFTR protein is not the only parameter that regulates CF inflammatory-associated mechanisms.

As for gene correction, treatments with pharmaceutical correctors did not show better results. The most surprising was the result with the lumacaftor (VX809), a drug developed for patients with homozygous F508del mutation and currently on the market¹⁸. This molecule did not exhibit any correcting effect; worse, it increased the production of multiple inflammatory cytokines. Genistein, 4-PBA, Curcumin and C407 showed differential results, with corrections observed either at the secretary or production levels. Because of the large hoarding on the use of the activator, curcumin, we were expecting significant effects of this molecule on the decrease of the pro-inflammatory cytokines. Previous studies have reported a correction of the defect in the CFTR F508del protein, both in *in vitro* and in mice^{23,28}. Unfortunately, the study in phase 1 in cystic fibrosis patients did not show any corrected effect on the CFTR-F508del protein^{16,39,40}. In addition, scientists from other laboratories have not been unable to find the beneficial effects of curcumin in mice²⁸. In our study curcumin corrected only IL8 production. Genistein, a powerful inhibitor of the tyrosine kinase activity associated to the EGF receptor and a potent activator of the CFTR channel, was reported to stimulate Cl⁻ secretion in endometrial epithelial cells, and to

activate CFTR in human airway epithelial cell lines^{41,42}. In our study Genistein only corrected IL6 secretion

Sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA), a special class of pharmacological agents used in the restoration of chloride transport defects, was shown to increase the number of CFTR F508del channels that reached the cell membrane. Its mode of action is still unknown. While this molecule is already used in human therapy for the treatment of diseases that are related to the urea cycle disturbance⁴³, its usefulness in the treatment of cystic fibrosis remains unproven^{25,26}. In our study it 4-PBA corrected IL8 and IL17A production.

A corrector provided by Dr A. Edelman, the C407 molecule that was reported to prevent the degradation of CFTR-F508del form by the proteasome and to increase its stability at the surface of the membrane; in our system this molecule corrected both IL8 and IL17E secretion.

Of all the correctors used, the most effective one is the miglustat, a molecule which Phase 2 clinical trial in CF patients ended in May 2017. The potential of this molecule to treat CF disease was discovered in 2006 through the work of Frédéric Becq's team. They demonstrated that this molecule could restore the activity of the CFTR protein²¹. Thanks to its use to treat other human rare diseases, such as Gaucher disease⁴⁴, its safety and tolerance were already assessed and clinical trials have been rapidly launched. In a study published in 2009, it was reported that daily treatment of human lung cells carrying homozygous F508del mutation by a low concentration of miglustat allowed a progressive correction of the protein's activity and reversed the phenotype²⁰. Researchers have indeed cultured sick human lung cells in the presence of miglustat for two months. The correction started after 3-4 days of treatment but overturned when the treatment stopped. In our study miglustat was the only molecule that corrected the secretion of TNF α and IL17A and the production of IL6, IL8 and IL17A. Miglustat also induced a decrease in the inflammatory levels of other cytokines. Hence, miglustat seems to be the best inflammatory corrector compared to other molecules (Figure 7).

Overall our results demonstrate that miglustat and the genetic correction of CFTR are good regulators of the increased inflammation observed in CF patients. Nevertheless, these treatments only reduced, but not fully corrected the inflammatory status. These results strongly suggest that beside CFTR protein, other protagonists might be involved in the regulation of CF- associated inflammatory mechanisms.

References

1. Riordan, J. R. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066–1073 (1989).
2. Dawson, D. C., Smith, S. S. & Mansoura, M. K. CFTR: mechanism of anion conduction. *Physiol. Rev.* **79**, S47-75 (1999).
3. Linsdell, P. Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp. Physiol.* **91**, 123–129 (2006).
4. Kerem, E. Mutation specific therapy in CF. *Paediatr. Respir. Rev.* **7 Suppl 1**, S166-169 (2006).
5. Bobadilla, J. L., Macek, M., Fine, J. P. & Farrell, P. M. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum. Mutat.* **19**, 575–606 (2002).
6. Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P. Ø., Wang, H. & Høiby, N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **85**, 7–23 (2015).
7. Ranganathan, S. C. *et al.* Early Lung Disease in Infants and Preschool Children with Cystic Fibrosis. What Have We Learned and What Should We Do about It? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 1567–1575 (2017).
8. Zeng, M. *et al.* Restoration of CFTR Activity in Ducts Rescues Acinar Cell Function and Reduces Inflammation in Pancreatic and Salivary Glands of Mice. *Gastroenterology* **153**, 1148–1159 (2017).
9. Hisert, K. B. *et al.* Restoring Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Reduces Airway Bacteria and Inflammation in People with Cystic Fibrosis and Chronic Lung Infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 1617–1628 (2017).
10. Bednarski, C., Tomczak, K., Vom Hövel, B., Weber, W.-M. & Cathomen, T. Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model. *PloS One* **11**, e0161072 (2016).
11. Cooney, A. L. *et al.* Lentiviral-mediated phenotypic correction of cystic fibrosis pigs. *JCI Insight* **1**, (2016).
12. Villate-Beitia, I., Zarate, J., Puras, G. & Pedraz, J. L. Gene delivery to the lungs: pulmonary gene therapy for cystic fibrosis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **43**, 1071–1081 (2017).
13. Steines, B. *et al.* CFTR gene transfer with AAV improves early cystic fibrosis pig phenotypes. *JCI Insight* **1**, e88728 (2016).
14. Kirby, E. F., Heard, A. S. & Wang, X. R. Enhancing the Potency of F508del Correction: A Multi-Layer Combinational Approach to Drug Discovery for Cystic Fibrosis. *J. Pharmacol.*

Clin. Toxicol. **1**, 1007 (2013).

15. Bangel-Ruland, N., Tomczak, K. & Weber, W.-M. Targeting ENaC as a Molecular Suspect in Cystic Fibrosis. *Curr. Drug Targets* **16**, 951–957 (2015).
16. Mall, M. A. & Galiotta, L. J. V. Targeting ion channels in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **14**, 561–570 (2015).
17. Pesci, E. *et al.* Novel Hits in the Correction of Δ F508-Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Protein: Synthesis, Pharmacological, and ADME Evaluation of Tetrahydropyrido[4,3-d]pyrimidines for the Potential Treatment of Cystic Fibrosis. *J. Med. Chem.* **58**, 9697–9711 (2015).
18. Brewington, J. J., McPhail, G. L. & Clancy, J. P. Lumacaftor alone and combined with ivacaftor: preclinical and clinical trial experience of F508del CFTR correction. *Expert Rev. Respir. Med.* **10**, 5–17 (2016).
19. Lubamba, B. *et al.* Airway delivery of low-dose miglustat normalizes nasal potential difference in F508del cystic fibrosis mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 1022–1028 (2009).
20. Norez, C., Antigny, F., Noel, S., Vandebrouck, C. & Becq, F. A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **41**, 217–225 (2009).
21. Norez, C. *et al.* Rescue of functional Δ F508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett.* **580**, 2081–2086 (2006).
22. Dechecchi, M. C. *et al.* Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **7**, 555–565 (2008).
23. Egan, M. E. *et al.* Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* **304**, 600–602 (2004).
24. Illek, B. *et al.* cAMP-independent activation of CFTR Cl channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein. *Am. J. Physiol.* **268**, C886-893 (1995).
25. Rubenstein, R. C., Egan, M. E. & Zeitlin, P. L. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J. Clin. Invest.* **100**, 2457–2465 (1997).
26. Rubenstein, R. C. & Zeitlin, P. L. A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 484–490 (1998).
27. Bhandari, A., Crawford, S. E., Huang, L. & Reenstra, W. W. Effects of oral genistein in mice. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.* **22**, 131–141 (2003).
28. Cartiera, M. S. *et al.* Partial correction of cystic fibrosis defects with PLGA nanoparticles

encapsulating curcumin. *Mol. Pharm.* **7**, 86–93 (2010).

29. Verkman, A. S. *et al.* Finding new drugs to enhance anion secretion in cystic fibrosis: Toward suitable systems for better drug screening. Report on the pre-conference meeting to the 12th ECFS Basic Science Conference, Albufeira, 25-28 March 2015. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **14**, 700–705 (2015).

30. Clancy, J. P. *et al.* Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* **67**, 12–18 (2012).

31. Cozens, A. L. *et al.* A transformed human epithelial cell line that retains tight junctions post crisis. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* **28A**, 735–744 (1992).

32. Neuberger, T., Burton, B., Clark, H. & Van Goor, F. Use of primary cultures of human bronchial epithelial cells isolated from cystic fibrosis patients for the pre-clinical testing of CFTR modulators. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **741**, 39–54 (2011).

33. Fulcher, M. L. *et al.* Novel human bronchial epithelial cell lines for cystic fibrosis research. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **296**, L82-91 (2009).

34. Ribeiro, C. M. P. Measurements of intracellular calcium signals in polarized primary cultures of normal and cystic fibrosis human airway epithelia. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **742**, 113–126 (2011).

35. Bartlett, J. A. *et al.* Newborn Cystic Fibrosis Pigs Have a Blunted Early Response to an Inflammatory Stimulus. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 845–854 (2016).

36. Pittman, J. E. *et al.* Association of Antibiotics, Airway Microbiome, and Inflammation in Infants with Cystic Fibrosis. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **14**, 1548–1555 (2017).

37. Khoury, O., Barrios, C., Ortega, V., Atala, A. & Murphy, S. V. Immunomodulatory Cell Therapy to Target Cystic Fibrosis Inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2017). doi:10.1165/rcmb.2017-0160TR.

38. Carrabino, S. *et al.* Dysregulated interleukin-8 secretion and NF-kappaB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **5**, 113–119 (2006).

39. Loo, T. W., Bartlett, M. C. & Clarke, D. M. Thapsigargin or curcumin does not promote maturation of processing mutants of the ABC transporters, CFTR, and P-glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 580–585 (2004).

40. Dragomir, A., Björstad, J., Hjelte, L. & Roomans, G. M. Curcumin does not stimulate cAMP-mediated chloride transport in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 447–451 (2004).

41. Andersson, C., Servetnyk, Z. & Roomans, G. M. Activation of CFTR by genistein in

human airway epithelial cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 518–522 (2003).

42. Deachapunya, C. & Poonyachoti, S. Activation of chloride secretion by isoflavone genistein in endometrial epithelial cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **32**, 1473–1486 (2013).

43. Guha, M. Urea cycle disorder drug approved. *Nat. Biotechnol.* **31**, 274 (2013).

44. Giraldo, P. *et al.* Twelve years of experience with miglustat in the treatment of type 1 Gaucher disease: The Spanish ZAGAL project. *Blood Cells. Mol. Dis.* (2016). doi:10.1016/j.bcmed.2016.10.01

Figure legends

Figure 1 : CFTR expression and function in normal (HBE) and cystic fibrosis (CFBE) human bronchial epithelial cells.

(A) HBE, CFBE and CFBE stably expressing wild-type (CFBE-wt) or deltaF508-CFTR were used in immunoblot assays to determine the expression level of cfr protein. Black arrow fully glycosylated mature CFTR (band c), Grey arrow core-glycosylated CFTR (band b), White arrow non glycosylated CFTR (band a). (B) The iodide efflux was used as a functional assay to determine the activity of CFTR chloride channel for the time indicated. (C) Immunoblot assay was used to evaluate the correcting effect of correctors, CFBE-ΔF were treated 24h with 10μM with the following correctors. Black arrow fully glycosylated mature CFTR (band c), Grey arrow core-glycosylated CFTR (band b), White arrow non glycosylated CFTR (band a).

Figure 2 : Evaluation of the intracellular inflammatory profile of HBE and CFBE cells.

The inflammatory profile was determined using ELISA assay for the indicated cytokines and chemokine. Protein extracts from cultured cells were used for the ELISA test. The results are reported relative to the mg of protein (n=8). Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls (P < 0.05).

Figure 3: Evaluation of the secreted inflammatory profile of HBE and CFBE cells.

The inflammatory profile was determined using ELISA assay for the indicated cytokines and chemokine. Medium from cultured cells were used for the ELISA test. The results are reported relative to the mg of protein (n=8). Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls (P < 0.05).

Figure 4: Evaluation of the intracellular inflammatory profile of HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

The inflammatory profile was determined using ELISA assay for the indicated cytokines and chemokine. Protein extracts from cultured cells were used for the ELISA test. The results are reported relative to the mg of protein (n=8). Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls (P < 0.05).

Figure 5: Evaluation of the secreted inflammatory profile of HBE, CFBE and CFBE-wt cells.

The inflammatory profile was determined using ELISA assays for the indicated cytokines and chemokine. Medium from cultured cells were used for the ELISA test. The results are reported relative to the mg of protein (n=8). Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($P < 0.05$).

Figure 6: Effect of different correctors on the inflammatory response of CFBE cells.

Following 24h treatment of CFBE cells with the indicated correctors. The inflammatory profiles were determined using ELISA assays for the indicated cytokines and chemokine. Medium and protein extracts from cultured cells were used for the ELISA test. The results are reported relative to the mg of protein (n=8). Values with an asterisk are significantly different from their corresponding controls ($P < 0.05$).

Figure 7: Positives effects of the used strategies.

Illustrates a table that summarizes the positive effects of all used strategies to correct intracellular or secreted inflammatory cytokines in CFBE cells. Checked boxes indicate positive corrections of a given cytokines either in extracellular media or in the intracellular compartment

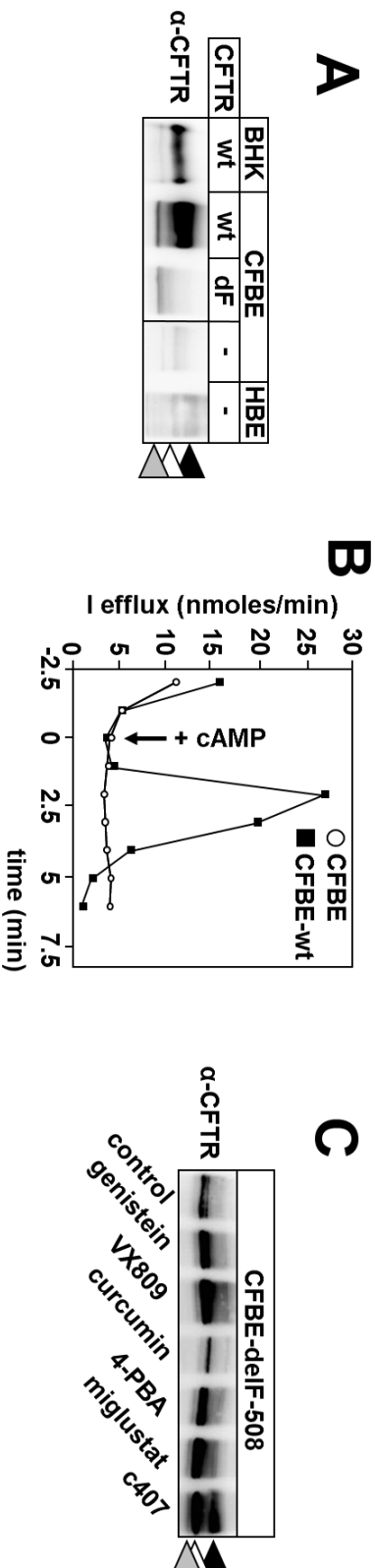


Figure 1

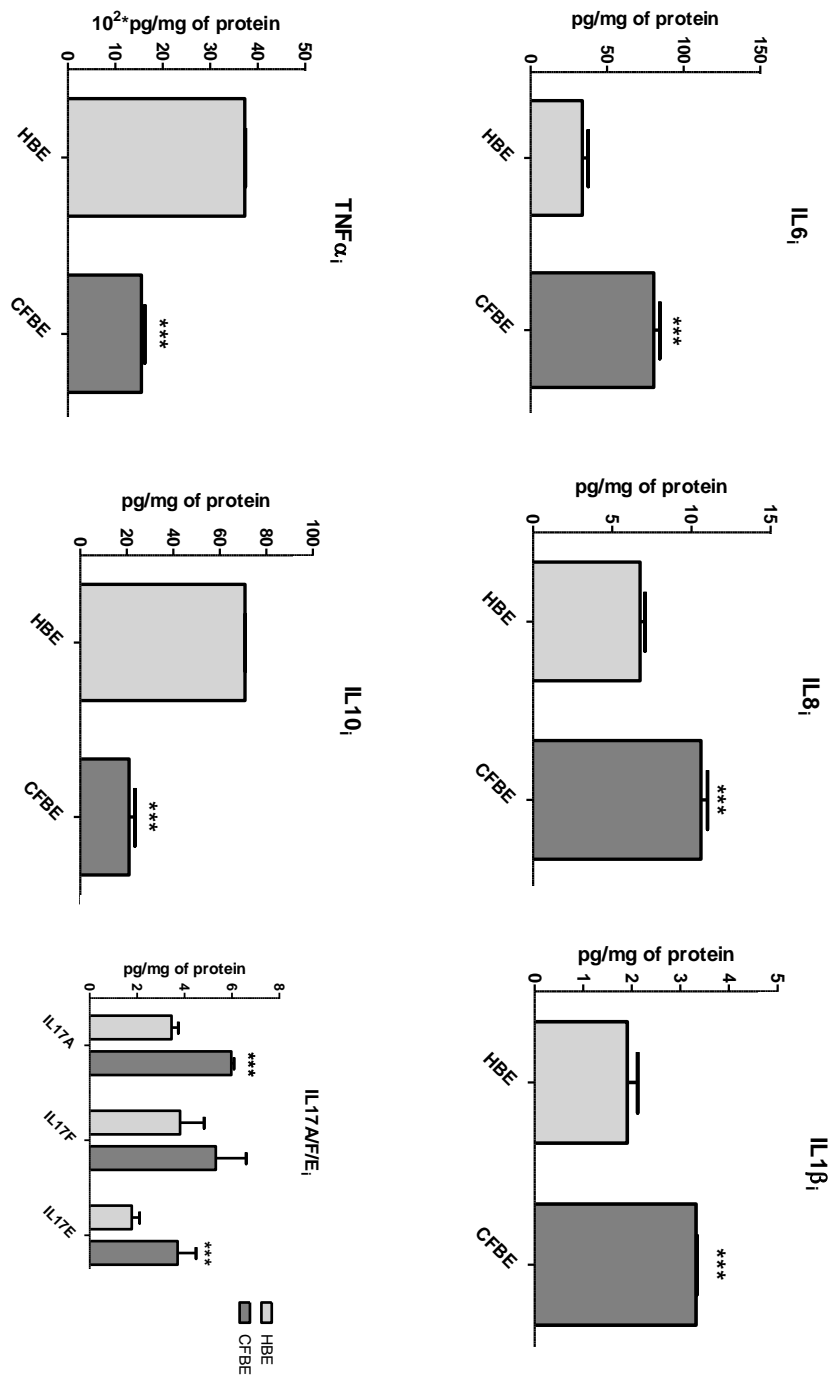


Figure 2

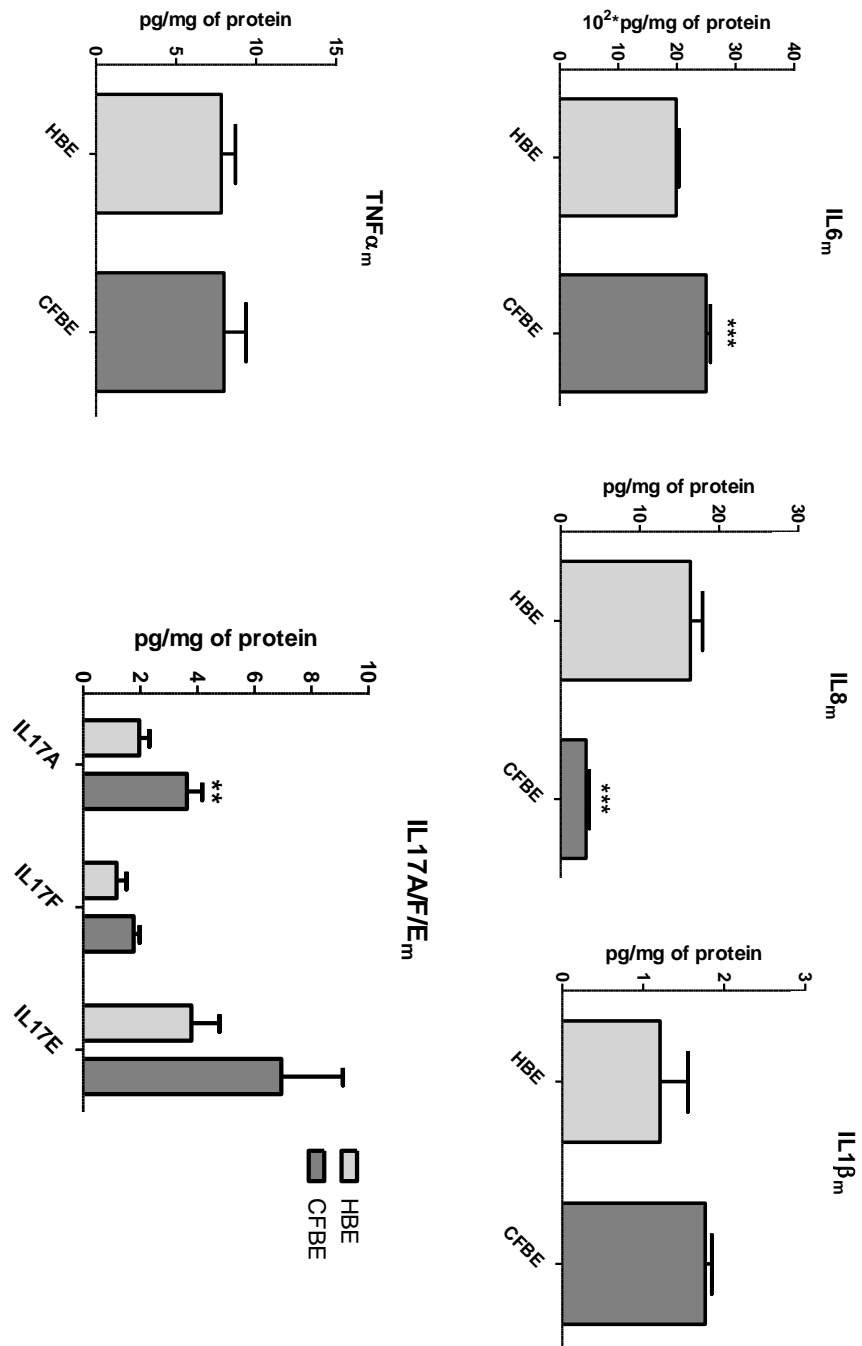


Figure 3

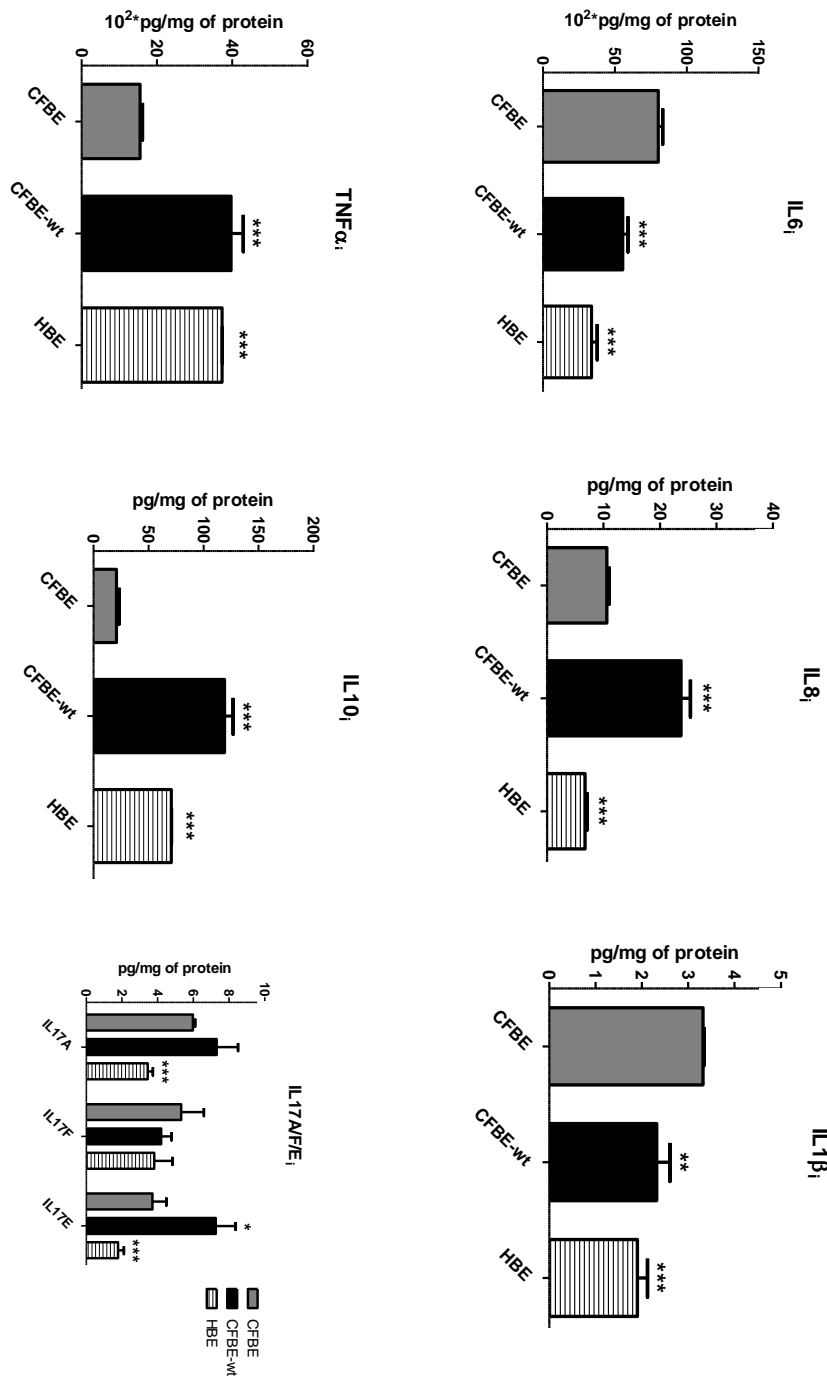


Figure 4

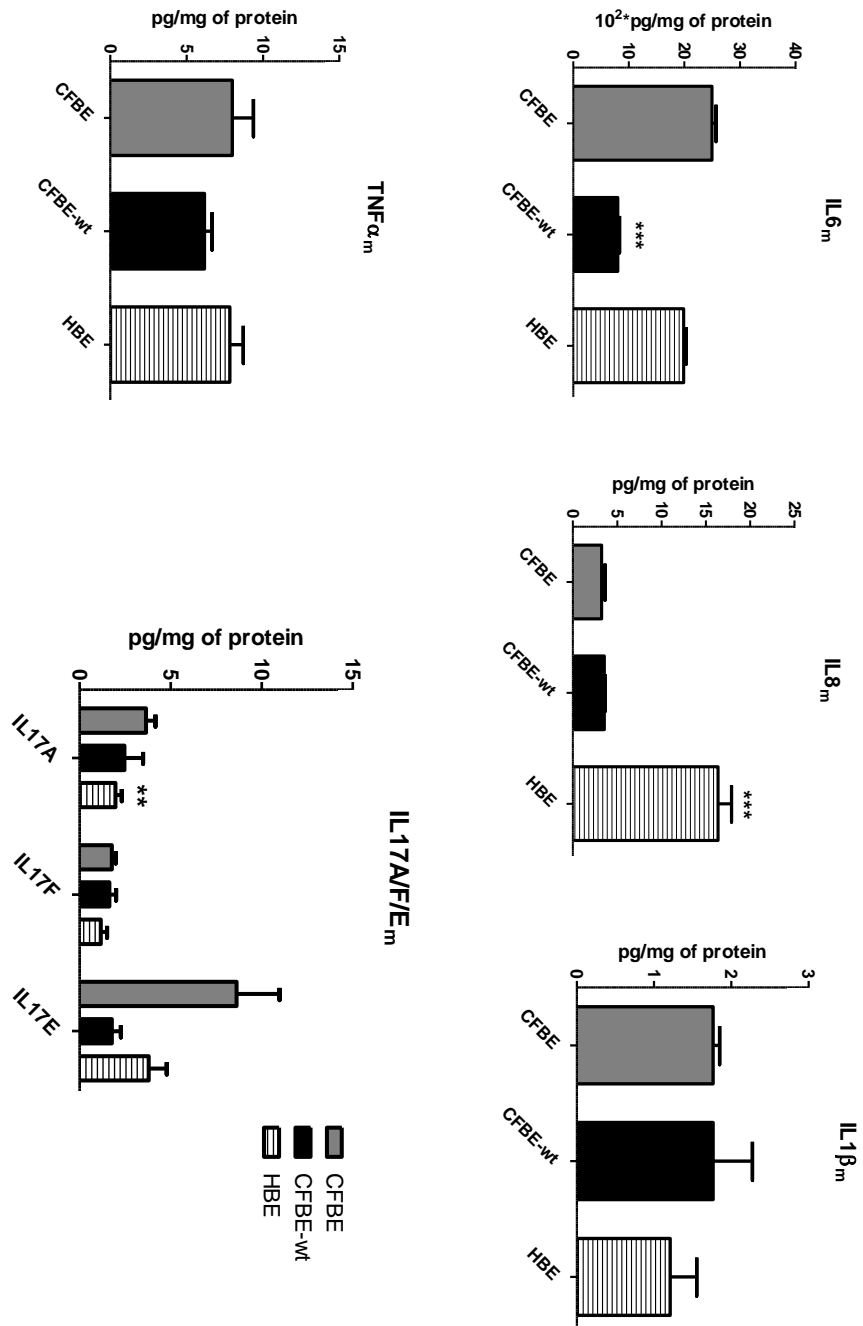
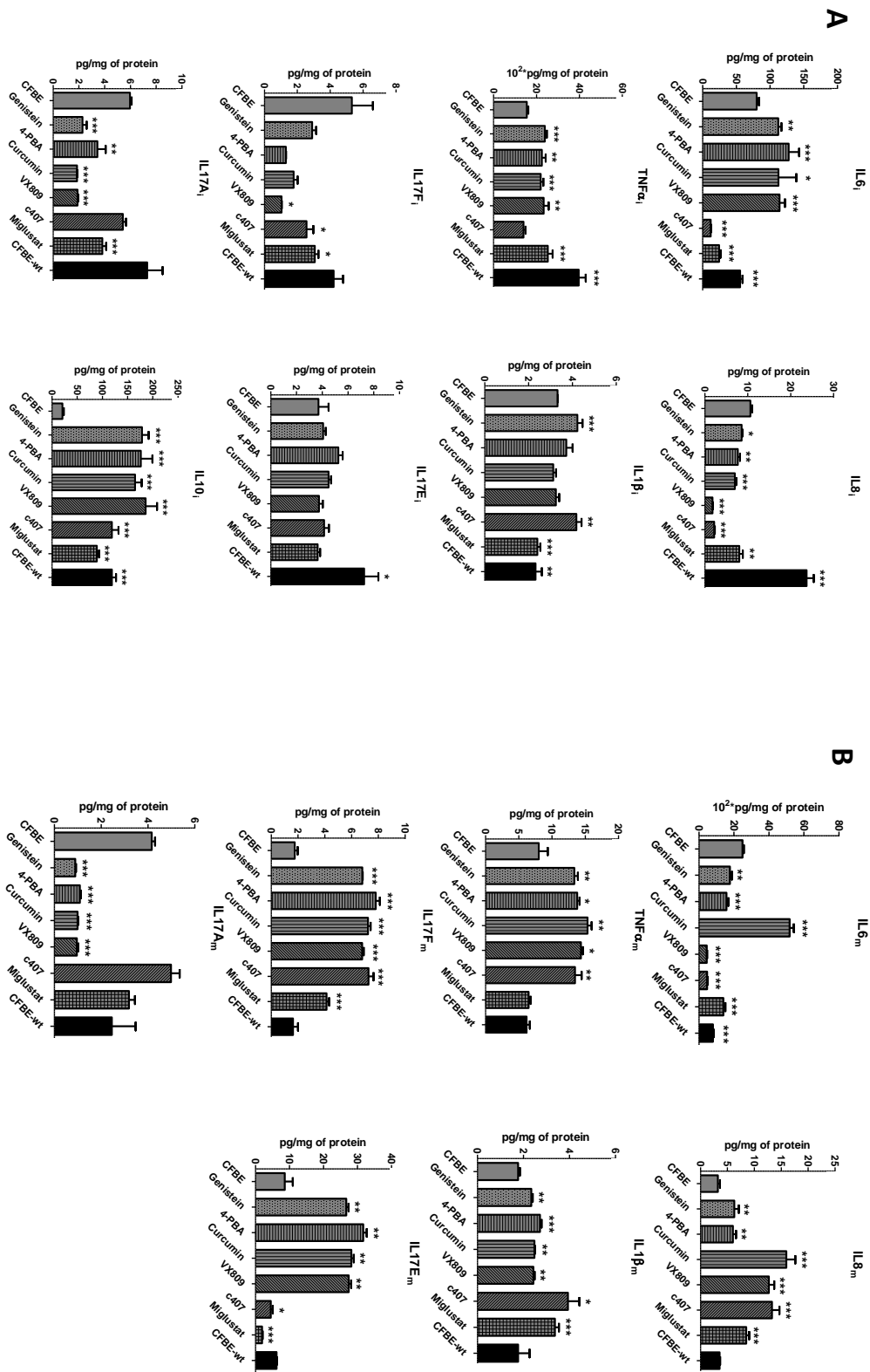


Figure 5



	IL6		IL8		IL10		TNF α		IL1 β		IL17F		IL17E		IL17A	
	Media	Intra	Media	Intra	Media	Intra	Media	Intra	Media	Intra	Media	Intra	Media	Intra	Media	Intra
VX809																
Genistein	<input checked="" type="checkbox"/>														<input checked="" type="checkbox"/>	
Curcumin				<input checked="" type="checkbox"/>												<input checked="" type="checkbox"/>
4-PBA				<input checked="" type="checkbox"/>												<input checked="" type="checkbox"/>
c407			<input checked="" type="checkbox"/>											<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>
Miglustat		<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>			<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>							<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
CFBE-WT							<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Figure 7

2.2 Discussion et perspective

Ici, nous avons mené une étude *in vitro* dans laquelle nous avons comparé les effets de la correction génétique et de la correction pharmacologique sur l'atténuation de l'inflammation intrinsèque des cellules CFBE. Nous avons dans un premier temps démontré que les cellules CFBE présentaient un état inflammatoire plus prononcé que celui des cellules HBE. Ces résultats sont comparables aux observations concernant les patients atteints de mucoviscidose [350, 351]. Les cellules CFBE produisent plus d'IL6, IL8, IL17A, IL17E et IL 1 β . Cette production élevée est probablement à mettre en relation avec la réduction de la production de la cytokine anti-inflammatoire, IL10, et avec celle du régulateur clé des réponses inflammatoires, le TNF α . Alors que la production d'IL6 et celle d'IL17A sont corrélées à leur sécrétion, cela n'est pas le cas pour l'IL8, dont la sécrétion est diminuée par rapport à son niveau de production. Ces résultats suggèrent que la régulation de ces cytokines est différente dans les cellules CFBE par rapport aux cellules HBE. Cette différence est probablement associée au défaut de l'activité de la protéine CFTR. Ce défaut d'activité semble directement influencer la sécrétion de l'IL8. Les mêmes résultats ont été obtenus sur des cellules en culture primaire, confirmant le rôle direct de la protéine CFTR dans la régulation de la sécrétion de l'IL8 [352].

Les résultats des profils inflammatoires des cellules CFBE-wt, montrent que la correction des CFBE avec la protéine CFTR normale ne nous permet pas de corriger dans son ensemble le profil inflammatoire des cellules CFBE. À l'exception de la correction du TNF α et de l'IL-1 β , et la diminution de la sécrétion d'IL-6, les autres cytokines n'ont pas été modifiées. En conclusion, même si le TNF α est corrigé, il y a encore des dérégulations importantes dans l'état inflammatoire de ces cellules. La correction partielle du niveau d'inflammation, après introduction du CFTR, semble indiquer que la correction génétique de CFTR n'est pas suffisante pour corriger les dérégulations dans l'état inflammatoire. Ces résultats suggèrent que la protéine CFTR n'est pas le seul paramètre impliqué dans la régulation des mécanismes associés à l'inflammation de la mucoviscidose.

Avec la stratégie de la pharmacothérapie, les réactions du profil inflammatoire sont un peu surprenantes, particulièrement avec le lumacaftor (VX809), médicament développé à l'intention des patients porteurs homozygotes pour la mutation delF508. Non seulement les résultats obtenus ne montrent aucun effet, mais, au contraire, le VX809 a même augmenté la production de plusieurs cytokines d'inflammation, aggravant ainsi l'état inflammatoire des cellules. Les résultats obtenus avec le génistéine,

le 4-ABP, le curcumin et la molécule c407 sont hétérogènes, avec des corrections observées soit au niveau de la sécrétion, soit au niveau de la production. Des études antérieures utilisant à la fois des lignées cellulaires et des souris CF avaient montré que le curcumin corrigeait significativement les défauts de la protéine CFTR delF508. Cette molécule n'avait cependant aucun effet significatif sur la correction du profil inflammatoire des cellules CF [343]. Cependant, on peut noter que, dans notre étude, le curcumin corrige la production d'IL-8 sans effet sur la sécrétion. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, chez les patients mucoviscidosiques, le traitement par le curcumin en phase 1 n'a pas été concluant avec l'absence d'effet correcteur sur la protéine CFTR-delF508 [70, 353].

Avec la génistéine, un puissant inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et un puissant activateur du canal CFTR, seule la sécrétion d'IL-6 a été corrigée. Le 4-phénylbutyrate de sodium (4-PBA), déjà utilisé pour le traitement de maladies liées à la perturbation du cycle de l'urée [345], n'a corrigé que la production d'IL-8 et celle de l'IL-17A. À l'inverse du 4-PBA, le correcteur c407 a corrigé la sécrétion d'IL-8 et d'IL-17E.

De tous les correcteurs utilisés, le plus efficace serait le miglustat, une molécule dont l'essai clinique de phase 2 chez les patients CF a pris fin en mai 2017 et dont les résultats sont toujours en cours d'analyse. Le potentiel de cette molécule pour traiter la mucoviscidose a été découvert en 2006 par l'équipe du Dr. Frédéric Becq qui a démontré que le miglustat pouvait restaurer l'activité de la protéine CFTR. Grâce à son utilisation dans d'autres maladies humaines rares, telles que la maladie de Gaucher, son innocuité et sa tolérance ont déjà été évaluées et des essais cliniques ont rapidement été lancés. Dans une étude publiée en 2009, il a été rapporté qu'un traitement quotidien des cellules pulmonaires humaines porteuses d'une mutation homozygote delF508 par une faible concentration de miglustat permettait une correction progressive de l'activité de la protéine CFTR. Dans cette étude des cellules pulmonaires humaines malades ont été cultivées en présence de miglustat pendant deux mois. La correction a commencé après 3-4 jours de traitement, et s'est arrêtée lorsque le traitement a cessé [354]. Dans notre étude, le miglustat est la seule molécule qui a corrigé à la fois la sécrétion de $TNF\alpha$ et IL-17A et la production d'IL-6, IL-8 et IL-17A. Le miglustat a également induit une diminution des niveaux inflammatoires d'autres cytokines. Ainsi, le miglustat semble être le meilleur correcteur inflammatoire par rapport aux autres molécules et présente un résultat semblable à celui que nous avons obtenu dans les cellules CFBE-wt.

Dans l'ensemble, nos résultats démontrent que la correction pharmacologique et la correction génétique de l'activité du canal CFTR ne présentent pas les mêmes effets sur les cytokines de l'inflammation des bronches mucoviscidosiques qui ont été testées. Ces résultats suggèrent que la protéine CFTR est partiellement à l'origine de l'inflammation associée à la mucoviscidose et que d'autres protagonistes sont impliqués dans la régulation des mécanismes inflammatoires lié à cette maladie. C'est l'hypothèse des « gènes modificateurs ». Notre étude montre que les stratégies de correction du défaut de sécrétion des ions chlorures pourront rétablir la qualité du mucus nécessaire pour une meilleure clairance mucociliaire et, par voie de conséquence la diminution de l'infection bactérienne. Cependant, l'inflammation intrinsèque propre aux cellules bronchiques reste à explorer.

L'expression de la protéine cellulaire (PrP^c) et son importance fonctionnelle dans l'épithélium bronchique : rôle dans la protection de la barrière jonctionnelle contre le stress oxydatif.

3.1 Introduction

La protéine prion cellulaire (PrP^c) est une sialoglycoprotéine à ancre GPI dont le mauvais repliement donne la forme Scrapie PrP^{Sc} qui est à l'origine des EST (Encéphalopathie spongiforme) comme le Creutzfeldt-Jakob, le Kuru ou le syndrome de Grestmann-Sträussler-Schneiker chez l'homme, ou la tremblante chez les moutons et les chèvres. Les EST résultent de la conversion de la PrP^c en PrP^{Sc} conduisant à son accumulation dans les cellules neuronales et entraînant par la suite la mort cellulaire. La protéine prion est constituée de cinq répétitions de huit acides aminés (qui lient avec une grande affinité le cuivre (Cu)) et de trois hélices α séparées par deux feuillets β antiparallèles. PrP^c possède aussi deux sites de N-glycosylation dont la glycosylation peut donner trois formes distinctes : non glycosylée, mono-glycosylée et bi-glycosylée [274, 355]. L'expression de PrP^c commence dès l'embryogenèse. Chez l'adulte, une forte expression a été détectée dans le cerveau, la moelle épinière et les neurones ainsi que dans les cellules gliales, les cellules des tissus périphériques (intestin, muscles, placenta, ...) et le sang [356]. De très nombreuses études ont porté sur la caractérisation de la forme pathologique du prion PrP^{Sc} principalement au niveau neuronal. Cependant la fonction physiologique de la forme cellulaire (PrP^c) reste à caractériser, en particulier dans les tissus extra neuronaux [274]. Néanmoins, il a été montré que les cellules déficientes en PrP^c sont beaucoup moins viables et plus sensibles aux dommages oxydatifs que les cellules qui en sont pourvues. De plus, la

réintroduction de PrP^c dans les cellules qui en sont privées augmente leur activité SOD et leur confère une protection contre l'apoptose [326]. PrP^c présente aussi une fonction enzymatique dépendante de sa capacité à lier le cuivre (Cu). Ces données suggèrent que la protéine PrP^c pourrait participer au contrôle du stress oxydatif par une augmentation de l'incorporation du métal Cu dans l'enzyme Cu/Zn-SOD, ou en agissant elle-même comme une protéine de type SOD.

Ces observations ont été étendues au tissu extraneuronal. En effet, l'absence ou la surexpression de PrP^c dans les cellules placentaires perturbe l'homéostasie du Cu et du stress oxydatif, suggérant que PrP^c a probablement un rôle de protection des cellules contre les effets toxiques du cuivre [333]. En plus de ces observations, il a été montré que la PrP^c était capable d'interagir avec plusieurs protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et de jouer un rôle dans leur régulation. Ces données confortent l'importance de PrP^c dans l'adhésion cellulaire et dans le maintien des complexes jonctionnels [357]. À côté des tissus intestinaux et placentaires, d'autres tissus tels que les poumons forment une barrière physiologique fonctionnelle. Dans l'épithélium respiratoire, un tissu qui fonctionnerait comme une barrière contre les pathogènes et les particules exogènes, l'expression et le rôle de la protéine PrP^c est encore inconnu.

Dans l'étude qui suit nous avons analysé l'expression de PrP^c dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (HBE). Ces cellules jouent un rôle clé dans la défense contre les agents pathogènes et les particules inhalées. Par ailleurs, ces cellules assurent une fonction majeure de clairance muco-ciliaire et confèrent une adhésion cellulaire très forte, caractéristique clé de l'épithélium pulmonaire. Dans la première partie de cette étude, nous avons caractérisé l'expression de PrP^c et sa localisation dans les cellules bronchiques HBE et alvéolaires, les A549. Son expression au niveau protéique et au niveau ARN messager a été étudiée. Nous avons également établi son profil de digestion par la protéinase K et déterminé son niveau de glycosylation. Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés au lien de la PrP^c avec le métal cuivre dans le contexte de la cellule pulmonaire. Nous avons ainsi analysé les effets dose-dépendants du Cu sur l'expression de PrP^c dans les lignées cellulaires HBE et A549. Afin de mieux comprendre l'effet du cuivre sur l'expression du PrP^c dans un système *in vivo*, nous avons évalué l'effet d'un traitement Cu sur l'expression du PrP^c dans le tissu épithélial bronchique de souris abreuviées durant 10 jours avec de l'eau contenant du cuivre. Comme l'homéostasie du cuivre est finement régulée et que toute perturbation de sa concentration physiologique entraîne une augmentation du stress oxydatif intracellulaire, nous avons testé le rôle de PrP^c dans la protection de la cytotoxicité induite par le Cu. Pour cela nous avons mesuré la viabilité des cellules HBE à la suite d'un traitement Cu. Ensuite, nous avons mesuré la production de ROS

et la concentration en Cu intracellulaire après traitement au Cu en l'absence ou en présence de PrP^c. Enfin, nous avons déterminé la localisation cellulaire de PrP^c dans les cellules et tissus humains, identifié ses partenaires, et déterminé l'impact de son invalidation sur l'intégrité des jonctions cellulaires. En conclusion, ces résultats ont démontré pour la première fois l'implication de la protéine PrP^c dans la formation et la stabilité des jonctions des cellules épithéliales bronchiques.

Cellular Prion Protein Expression and Functional Importance in Human Bronchial Epithelia: Role in the protection of the junctional barrier against oxidative stress.

Amal Kouadri¹, Mariam El Kathib¹, Johanna Cormenier¹, Sylvain Chauvet¹, Laurence Macari¹, Pierre Richaud³, Chrystelle Coraux⁴, Isabelle Michaud-Soret¹, Nadia Alfaidy² and Mohamed Benharouga¹

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, BIG, CBM, F-38000 Grenoble, France.

² Univ. Grenoble Alpes, INSERM, CEA, BIG, BCI, F-38000 Grenoble, France.

³ Univ. Aix-Marseille, CNRS, CEA, Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM), UMR 7265, CEA Cadarache, Saint-Paul-lez Durance F-13108, France.

⁴ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-S 903, Reims, France.

Running Title: Role of PrP^C protein in the lung epithelial barrier.

Address correspondence to:

Dr. Mohamed Benharouga

LCBM-UMR5249

DRF-BIG, CEA-Grenoble

17 rue des Martyrs, F-38054, Grenoble cedex 09, France

Téléphone: (33)-4-38-78-44-51

Fax: (33)-4-38-78-54-87

E-mail: mohamed.benharouga@cea.fr

Word count: 5925

Reference numbers: 60

Greyscale illustrations: 5

Color illustrations: 3

Abstract

Aim: The protection of the respiratory epithelium against inhaled pollutants and microorganisms relies primarily on the bronchial epithelium that acts as a defensive barrier. The latter is often compromised in inflammatory airway diseases that are characterized by excessive oxidative stress responses that lead to bronchial epithelial shedding, barrier failure, and increased bronchial epithelium permeability. Among proteins that have been reported to be expressed in the junctional barrier and participate in the regulation of the response to oxidative and environmental stresses is the cellular prion protein (PrP^C). However, the role of PrP^C is still unknown in the bronchial epithelium. Herein, we investigated the cellular mechanisms by which PrP^C protein participates into junctional complexes formation, regulation, and oxidative protection in human bronchial epithelium.

Results: Both PrP^C mRNA and mature protein were expressed in human epithelial bronchial cells. PrP^C was localized in the apical domain and became lateral, at high levels of cell polarization, where it co-localized and interacted with adherens (E-cadherin/ γ -catenin) and desmosomal (desmoglein/desmoplakin) junctional proteins. No interaction was detected with tight junction proteins. Disruption of such interaction induced the loss of the epithelial barrier. Moreover, we demonstrated that PrP^C protection against oxidative stress was involved in multiple processes, including the stability of adherens and desmosomal junctional proteins.

Innovation: PrP^C is a pivotal protein in the protection against oxidative stress-associated degradation of adherens and desmosomal junctional proteins.

Conclusion: Altogether these results demonstrate that the loss of the epithelial barrier integrity by oxidative stress is minimized by the activation of PrP^C expression which deregulation might be associated to respiratory diseases.

Introduction

The bronchial epithelium forms a critical barrier that is continually exposed to a variety of environmental agents such as pollutants, allergens, particles and microorganisms that are capable of causing tissue injury. These injuries are normally countered by the establishment of an effective line of defense and repair mechanisms (44, 56).

The periciliary surface fluid and mucus forms the first line of defense of the airways, including the production of abundant mediators and innate airway immune responses (25). The second line is physical and consists of three main types of intercellular junctional complexes responsible for the sealing of the epithelium: tight junctions, adherens junctions and desmosomes (25, 34, 28, 22).

The disruption of the intercellular junction of bronchial epithelium is associated with an increase in epithelial cell permeability (EP) and an invasion by infectious agents (38, 32, 30, 59). This phenomenon constitutes a hallmark of inflammatory and chronic infectious diseases, such as cystic fibrosis (CF) (10).

One of the parameters that was reported to contribute to the epithelial barrier's injury and dysfunction is the oxidative stress status, induced by endogenous productions of reactive oxygen species (ROS) during airway injuries (33, 35, 41, 23). Different antioxidant systems, including enzymes and ROS scavenger/chelator molecules, as well as several other proteins important for epithelial barrier protection are triggered to protect and repair the injured epithelial barrier (58, 40). The cellular prion protein (PrP^C) is one of the proteins that have been reported to be involved both in antioxidant protection (1, 27) and in maintaining the integrity of the intestinal epithelial barrier (42, 47).

PrP^C is a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored glycoprotein known for its unique ability to undergo structural conversion from a normal isoform (PrP^C) into a pathogenic conformer known as scrapie (PrP^{Sc}) (49). The accumulation of PrP^{Sc} aggregates in the brain is a distinctive feature of transmissible spongiform encephalopathies (TSE), a group of animal and human lethal neurodegenerative diseases (13). The physiological role of the cellular PrP has mainly been associated to stress-protection (52, 60), copper homeostasis (2) and neuronal excitability (31). Nevertheless, other functions related to cellular processes and metabolism have also been reported for this protein (11).

In epithelial cells, PrP^C localization is still a matter of discussion and the majority of data were obtained in enterocytes and MDCK cells (45, 55, 42, 39, 57, 43, 15). In these cells, PrP^C was reported to be directed to the apical and/or basolateral membranes (45, 55, 42, 39, 57, 43, 15).

Recently, in a fully polarized MDCK cells, a basolateral to apical transcytosis was also reported for the full-length PrP^C and its fragments of cleavage (3). However, in highly polarized enterocytes, PrP^C was found to be targeted to the lateral junctional complexes of adjacent cells, where it has been shown to interact with different junctional proteins (3, 55).

Nevertheless, the role of the PrP^C in the oxidative stress protection and in copper homeostasis in epithelial cells, including bronchial epithelial cells, is still poorly documented. Moreover, the link between its protective function and its localization in the apical and/or basolateral domains of bronchial epithelial cells is still unknown.

We used the human bronchial epithelial cells (16HBE14o-) as a model to investigate the expression, localization, regulation and function of PrP^C in relation to oxidative stress and copper status. 16HBE14o- is a well-established cell line characterized by a high level of polarization that form a functional physiological barrier (18).

Herein, using 16HBE14o- cells, we demonstrated that PrP^C protein i) is expressed at the apical and basolateral sides ii) undergoes apical-to-basolateral transcytosis in fully polarized 16HBE14o- cells, iii) localizes and interacts with adherens junction proteins, vi) impacts cell-cell adhesion and cell junctions' integrity. More importantly, we demonstrated that PrP^C is involved in copper homeostasis and in the protection against the collapsing of the bronchial epithelial barrier caused by oxidative stress.

Altogether, this study highlights, for the first time, the role of PrP^C protein in the protection of the lung barrier against oxidative stress by increasing its proper-expression and by stabilizing the key junctional proteins. These findings will improve our understanding of the oxidative stress-associated to the loss of the integrity of the epithelial barrier in inflammatory and chronic infectious lung diseases.

Results

PrP^C expression and characterization in human bronchial epithelial cells

The expression of PrP^C protein was examined in human pulmonary epithelial cells. We used a well-established transformed bronchial epithelial cell line 16HBE-14o- (HBE) (14) that was kindly provided by Dr. D.C. Gruenert (University of California, CA) and A549, a human lung adenocarcinoma epithelial cell line. These cells are widely used as *in vitro* models to study type II pulmonary epithelial cells (ATCC, 20).

Both cell lines are able to grow as adherent monolayer cells by developing cell-cell interactions through junctional complexes. However, only HBE cells are able to develop a progressive and high trans-epithelial resistance (TER), a well indicator of the tightness of intercellular junctional barriers. The evolution of TER for HBE and A549 monolayers is depicted in figure 1S. In our conditions, A549 reached a maximum TER-value of approximately 18 Ω/cm^2 after 9 days of culture, while HBE cells developed a TER of $\sim 650 \Omega/\text{cm}^2$ (Fig. 1S). Comparable TER-values have been reported, previously (19). These findings confirm that despite normal distribution of junctional barrier proteins in the both cell types, A549 cells are not able to develop comparable tightness to HBE cells. This makes HBE cells a good model to study the role of proteins that are involved in the development and the maintenance of intercellular junctions.

Using RT-PCR, we demonstrated that PrP^C gene is expressed in HBE and A549 cells (Fig. 1A). As control, we used N2a, neuronal cells commonly used to study PrP^C (37, 48, 21), and *HTR-8/SVneo cells*, an anchoring trophoblast cell line, in which PrP^C expression has previously been characterized (2). PrP^C mRNA was highly expressed in HBE compared to A549 and N2a cells (Fig.1B). These results were confirmed by immunoblot assay (Fig. 1C). The anti-PrP antibodies recognized three different PrP^C forms in HTR, N2a, A549 and HBE cells. These forms correspond to the unglycosylated (U \sim 21 kDa), the immature glycosylated (I \sim 27 kDa), and the mature highly glycosylated PrP^C (H \sim 33 kDa) (Fig. 1C).

At the cellular level, PrP^C maturation is characterized by its degree of glycosylation and by its expression at the plasma membrane (24). As previously described (15), the glycosylation of mature PrP^C was sensitive to N-glycosidase F (F) and insensitive to endoglycosidase H (H), indicating the expression of mature PrP^C in A549 and HBE cells (Fig.1D).

To further characterize PrP^C expression, we analyzed its digestion profile using the proteinase K (PK) enzyme. It is well established that only PrP^{SC} is resistant to PK, while PrP^C is completely digested (9). Our results showed that the PrP^C protein expressed in HBE and A549 cells were totally digested by PK (Fig. 1E), indicating that the PrP^C protein detected in lung epithelial cells exhibits a normal conformation.

Human tissue and cellular localization of PrP^C

The results reported in figure 1 demonstrated that PrP^C is expressed in human bronchial epithelial cells, nevertheless the precise cellular localization was still to be determined.

To characterize the localization of PrP^C protein in human bronchial epithelial cells and to analyze the tissue distribution in human bronchi, we performed both immunohistochemical and immunofluorescence analyses using human healthy lung sections and fixed A549 and HBE cells, respectively (Fig. 2A-E).

PrP^C protein was mainly detected in cilia cells (Fig. 2Ab). This expression appeared to be localized in the cytoplasm, and at the lateral and apical sides (Fig. 2Ab). Low expression was observed in the connective tissue (Fig. 2Ab). Incubation in the absence of the primary antibody confirmed the specificity of PrP^C detection at the bronchial level (Fig. 2Aa).

For the cellular localization, we used immunofluorescence cell imaging and X/Z image reconstitution to analyze the distribution of PrP^C in exponentially growing (3 days of culture) or in polarized (10 days of culture) A549 and HBE cells. When A549 and HBE cells were used before the establishment of a cell-cell junction (3 days), PrP^C protein was detected at the apical, lateral and in the cytoplasmic domains (Fig. 2B and 2C). Interestingly, in confluent and polarized cells (10 days), only HBE cells that developed a high TER (Fig. 1S-A) exhibited a unique lateral localization of PrP^C (Fig. 2D and 2E), while A549 cells, even after 10 days of culture, did not display any changes in the PrP^C distribution, compared to those observed after 3 days of culture (Fig. 2D and 2E).

Altogether these results reveal that PrP^C distribution in HBE cells is dependent upon the cell polarization, highlighting its potential role in the maintenance and/or control of the cell junction status.

PrP^C colocalizes with key junctional proteins

Since the immunolocalization results showed that PrP^C was localized to the lateral membrane of polarized HBE cells (Fig.2), we investigated the co-localization profile of PrP^C with different junctional resident proteins using immunofluorescence imaging cells, combined with X/Z image reconstitution. PrP^C was found to co-localize with γ -catenin and E-cadherin, two representative proteins of the adherens junctions (Fig. 3A and 3B). PrP^C also co-localized with desmoplakin and desmoglein, two proteins of the desmosome junctions (Fig. 3A and 3B).

However, no co-localization was found with ZO-1 protein, a member of the tight junction (Fig. 3A and 3B). In A549 cells, PrP^C protein also co-localized with E-cadherin, γ -catenin, and desmoplakin (Fig. 1S-B and 1S-C).

Because it was reported that PrP^C protein could also be localized into the nucleus of intestinal cells (6), we searched for such localization in the HBE cells. Very light staining was observed in the nucleus of HBE cells, suggesting a possible nuclear localization of PrP^C protein in this cell type. To verify the existence of such localization, we performed a nucleus staining using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), a fluorescent stain that binds strongly to DNA, anti-Ki-67, a nucleus resident protein that is associated with cell proliferation, and an anti-PrP^C antibody. Figure 3C shows that Ki-67 and DAPI co-localized in the nucleus. However, no staining and/or colocalization was found with the PrP^C protein (Fig. 3C), suggesting that the localization and the role of PrP^C in lung bronchial epithelial cells are restricted to the plasma membrane.

PrP^C interacts with junction-associated proteins and is involved in the maintenance of the junctional barrier

The co-localization results suggested that PrP^C protein might interact with junction-associated proteins. To verify this hypothesis, we immunoprecipitated PrP^C protein using an anti-PrP^C specific antibody (SAF 32). The targeted proteins were detected using western-blot analysis. We demonstrated that PrP^C does not interact with ZO-1 (Fig. 4A). However, PrP^C interacts with γ -catenin, E-cadherin, desmoplakin and desmoglein (Fig. 4A). These results suggest the involvement of PrP^C in the establishment of the junctional complexes in the bronchial epithelial tissue.

To test this hypothesis, PrP^C expression was knocked down using siRNA strategy, and the TER was measured. The TER was assessed during 8 days of culture to determine junction formation and strength (Fig. 4B). TER levels at days 8 of culture were plotted in figure 4C. As expected, TER increased in a time-dependent manner and reached a plateau after 8 days of culture (~620 Ω .cm²), which reflects the formation of cell-cell junction (Fig. 4B and 4C). Interestingly, in PrP^C-knockdown HBE cells the TER levels were lower (~50%, ~300 Ω .cm²) compared to the control condition (Fig. 4B and 4C).

Altogether, these results showed for the first time, the direct involvement of PrP^C protein in the junction formation of bronchial epithelial cell.

Cu upregulates PrP^C expression in human bronchial epithelial cells and in mice bronchial epithelial tissue

Since PrP^C protein binds with high affinity 5 copper ions (8), we first analyzed the dose and time-dependent effects of Cu on PrP^C expression in HBE cells. After Cu stimulation, PrP^C expression gradually increased in a concentration- (Fig. 5A and 5B) and time-dependent manners (Fig. 5D). PrP^C protein levels were quantified and normalized based on the levels of

the alpha subunit of Na⁺/K⁺-ATPase (Fig. 5B). As shown in Fig. 5A, PrP^C was detected in untreated HBE cells as U-, I- and H-glycosylated forms. Following Cu stimulation, the three glycosylated forms gradually increased after 24h of treatment (Fig. 5A and 5B). Similar to PrP^C protein expression, the PrP^C mRNA levels were also significantly increased in response to Cu treatment (Fig. 5C and 5E), suggesting a transcriptional effect.

The high level of the H-glycosylated form of PrP^C observed following Cu treatment suggested an increase of PrP^C insertion into the plasma membrane. This hypothesis was confirmed by cell surface biotinylation assay (Fig. 6A). Image analysis revealed that, compared to the control condition (absence of Cu), the abundance of biotinylated PrP^C was increased ~25% following 24h of Cu-treatment (100µM), suggesting that the H-glycosylated form is nearly totally inserted into the plasma membrane.

Cu increases PrP^C expression, specifically at the junctional side of HBE cells

To determine the HBE cells membrane domain (apical, lateral and/or basolateral) in which the H-form of PrP^C protein was expressed following Cu treatment (Fig. 6A and B), we used immunofluorescent assays (Fig. 6C and 6D). Following Cu treatment, we observed an increase in PrP^C expression in non- and in permeabilized HBE cells (Fig. 6C, X/Y). The X/Z image reconstitution (Fig. 6C, X/Z) demonstrates that the plasma membrane fluorescence increased specifically in the lateral side. The quantification of the intensity of the lateral fluorescence indicated an increase of ~65% and ~40% in non- and permeabilized HBE cells, respectively (Fig. 6D), suggesting that PrP^C insertion at the lateral side might play an important role in the protection of the junctional barrier against the effects of oxidative stress in bronchial epithelial cells.

To get more insights into the effect of copper on PrP^C expression in an *in vivo* system, we evaluated the effect of copper treatment on PrP^C expression in bronchial epithelial tissue, by watering 8-10 weeks C57BL/6 mice with aquatic solution containing copper. The efficiency of Cu treatment was determined by the measurement of blood Cu concentrations as previously reported by our group (2).

Immunohistochemistry analysis of lung tissues collected from control and copper treated mice (Fig. 3S) showed that PrP^C was expressed in ciliated and basal cells in control mice (Fig. 3S-b and c). Following copper treatment, the PrP^C expression increased in bronchial tissues (Fig. 3S-c). Altogether, these results suggest that there might be a strong relationship between the concentration of extracellular copper and the level of PrP^C expression in bronchial epithelial tissue.

Elevated PrP^C levels protect against Cu accumulation, Cu-induced ROS production, and bronchial epithelial cell death

Copper homeostasis is finely regulated and any disruption of its physiological concentrations causes an increase in the intracellular oxidative stress. The increase in PrP^C expression upon Cu treatment (Fig. 5) may reveal a stress protective response within the cell. To test the role of elevated PrP^C expression in preventing the cytotoxicity induced by Cu, we first measured the HBE cells viability using the MTT assay. After 24 h of incubation with the indicated Cu concentrations, HBE cells exhibited a significant cell death of ~30% at 100 μ M (Fig. 7A). Similar degree of cell death was observed at 200 μ M (Fig. 7A).

Based on the high proportion of dead cells, we hypothesized that this might be the consequence of an oxidative stress induced by the increase of intracellular copper concentrations. Using ICP-AES assay, we confirmed that the intracellular concentrations of Cu increased in a dose-dependent manner (Fig. 7B). To confirm the relationship between copper and the levels of PrP^C expression, we knocked down the cellular prion protein using siRNA strategy. The efficiency of the PrP^C knockdown was demonstrated both at the mRNA and protein levels (Fig. 2S-A and 2S-B). Knockdown of PrP^C had no significant effect on cell survival (Fig. 7C). A significant increase in cell death was however observed in PrP-depleted HBE cells (~80% at 24h) following incubation with 100 μ M of Cu (Fig. 7C).

Then we monitored ROS production and intracellular Cu content following Cu treatment in the absence or presence of PrP^C. After exposure of HBE cells to 100 μ M of Cu, the DCF fluorescence, indicative of ROS production, increased compared to untreated HBE cells (Fig. 7D). In the PrP^C-silenced HBE cells, the level of DCF fluorescence was similar compared to the control HBE (Fig. 7D). The treatment of PrP-knockdown HBE with 100 μ M of Cu increased ROS accumulation by ~2-fold (Fig. 7D).

Finally, using PrP-knockdown HBE cells we confirmed that PrP^C participates into the regulation of the intracellular Cu concentration (Fig. 7E). Using ICP-AES we found that Cu concentration in normal HBE was ~0.02 μ g/10⁶ cells (Fig. 7E). A slightly elevated copper levels (~0.03 μ g/10⁶ cell) were observed in PrP^C-silenced HBE cells (Fig. 7E). When Cu was added during 24h, the intracellular copper concentration was increased to ~0.8 μ g/10⁶ cell in wild type and to ~1.3 μ g/10⁶ cell in PrP^C-depleted HBE, respectively (Fig. 7E).

PrP^C protein protects the junctional proteins against Cu oxidative effects

The functional effects of Cu on the permeability of the junctional barrier in polarized HBE cells were monitored by measuring TER values upon their treatment with 100 μ M of Cu, from the apical side, for the indicated times. As shown in Fig. 8A, copper ions decreased TER values in

a time-dependent manner, as evidenced by the decrease in TER values (~20%) (Fig. 8A). The levels of TER measured in the HBE cells treated with copper were compared to those obtained in PrP^C-knockdown HBE cells (Fig. 8B), at day 4 of confluence.

The results indicated that in HBE cells the decrease in PrP^C expression (siPrP^C) increased cell permeability (~50%) compared to Cu treatment (~18%). Our results suggest that the increase in PrP^C expression in the lateral side of bronchial epithelial cells (Fig. 6) protects the junctional barrier against the Cu-inducing oxidative stress (Fig. 7) that might affect the levels of expression of junctional protein, as was previously reported (17).

To test our hypothesis, we first evaluated the effect of copper treatment on the steady state expression of tight junctions (ZO-1, occluding (Occ)), adherents (γ -catenin (γ -Cat) and E-cadherin (E-Cad)) and desmosome (desmoplakin (Dep)) junctions. The results showed that in the presence of copper only ZO-1 expression decreased in a time-dependent manner (Fig. 8C). Neither γ -Cat/E-Cad nor desmoplakin proteins were affected by the copper treatment (Fig. 8C).

Subsequently, we assessed the stability of ZO-1 and occludin proteins using cycloheximide (CHX) assays in the absence or in the presence of copper. As reported in figure 8D the degradation of ZO-1 and γ -catenin were accelerated in the presence of copper.

Using PrP^C-knockdown HBE cells, we evaluated the role of PrP^C protein using cycloheximide (CHX) assays in the absence or in the presence of copper (Fig. 8E).

Since there was no co-localization, or interaction between PrP^C and ZO-1 protein (Fig. 3 and 4), we were not surprised to observe that the degradation rate of ZO-1 was not accelerated in PrP^C-knockdown HBE cells in the absence or in the presence of copper (Fig. 8E). However, the degradation rate of desmoplakin (Dep) and desmoglein (Deg), proteins that interact with PrP^C, was significantly increased in PrP^C-knockdown HBE cells, particularly in the presence of copper (Fig. 8E). These results demonstrate that by interacting and stabilizing the junctional proteins (adherens and desmosomes), PrP^C participates in the oxidative stress protection and in the maintenance of the bronchial epithelial junctional barrier.

Discussion

The present study is the first to demonstrate that PrP^C is expressed in the human bronchial epithelial cells, which form a physical barrier to inhaled toxic particles, bacteria and viruses (50). Using multiple approaches, we provide strong evidences for a novel role of the PrP^C protein in the protection of the bronchial epithelial barrier against potentially generated oxidative stress.

The *in vivo* studies performed both in mice and human demonstrated that the PrP^C protein is expressed in the bronchial epithelial cells. For the *in vitro* studies, we used 16HBE14o- (HBE) cells, a bronchial epithelial model that expresses different junctional proteins and has the ability to form a functional epithelial barrier (54).

PrP^C expression, glycosylation and digestion profiles detected in A549 and HBE cell lines were similar to those reported in intestinal epithelial cells (42, 43) and placental trophoblast cells (2). The amount of PrP^C protein was 4 and 5 times higher in human HBE cells compared to human (SH-SY5Y) and mice (N2a) neuronal cells, respectively (data not shown and Fig. 1C), suggesting an important role for PrP^C in the bronchial epithelium function. Compared to renal and intestinal MDCK and Caco-2 epithelial cells, respectively (15, 42), HBE cells display also a high number of *PrP* gene copies and a high level of PrP^C protein.

To date, there is no consensus regarding the precise localization of the PrP^C in epithelia. Several groups, including ours, have proposed an apical localization of PrP^C in MDCK cells (15, 12), (51), which diverge from other studies showing a baso-lateral localization (55, 57). In bronchial epithelial cells, PrP^C showed a diffuse staining with an apical and lateral localizations in both HBE and A549 cells, which became exclusively lateral after 10 days of culture for HBE cells. These findings suggest that PrP^C localization is either controlled by the degree of epithelial cell polarization or that the PrP^C protein contributes to epithelial cell fusion and polarization. Such transcytosis trafficking has been recently observed in polarized epithelial MDCK cells (3).

PrP^C was detected in junctional complexes of the lateral membranes of adjacent polarized HBE cells where it was found to co-localize and interact with E-cadherin and desmoglein, two transmembrane proteins that bridge the space between adjacent epithelial cells (36), and with their cytoplasmic partner, γ -catenin (plakoglobin) and desmoplakin, respectively. Interestingly, no co-localization, or interaction of PrP^C was reported with tight junction proteins. Similar results were described in enterocytes, where PrP^C was reported to be targeted to cell–cell junctional zone and to interact with several desmosomal (desmoglein-2, desmoplakin, γ -catenin), but not with adherens proteins (42). The absence of interaction with E-cadherin in enterocytes cells, even if a cellular co-localization was observed (42), suggests that in the

bronchial epithelium such interactions might be important for the stability and the function of the junctional barrier. These conclusions were supported by the loss of ~50% of the TER level after silencing the *PrP* gene in polarized HBE cells (Fig. 4B).

Interestingly, as reported for trophoblast cells (2), the incubation of HBE cells with Cu increased PrP^C plasma membrane insertion, providing evidences for a potential role of PrP^C as a Cu sensor and/or chelator at the cell surface to protect these cells from Cu excess. However, in neurons, it has been reported that treatment with Cu increased PrP^C endocytosis (46), suggesting that the role of PrP^C protein in copper homeostasis is cell-dependent. Importantly, our *in vivo* approach substantiated the increase of PrP^C expression at the bronchial level, upon Cu intake by the mice.

The increase in PrP^C expression following Cu treatment caused a significant increase in the intracellular Cu concentration, along with an increase in ROS production. Importantly, the loss of the expression of PrP^C protein, in the presence of Cu, caused dramatic effects on HBE viability and increased Cu content and ROS production (Fig. 7), highlighting the stress protective role of PrP^C protein in bronchial epithelial cells. These results are in line with published data (52, 60) reporting a stress protective role of PrP^C protein.

Nevertheless, the link between the role of PrP^C in bronchial epithelial barrier (Fig. 4) and its associated role against the oxidative stress (Fig. 7) is still to be established.

One of the consequences of chronic oxidative stress in the lung is the bronchial epithelial shedding and the breakdown of epithelium cohesion (29, 4, 5). Several reports in the literature have shown that damages caused by free radicals in epithelial cells are associated with an increase in the tight junction's permeability (4, 53, 5). In our system, copper treatment of HBE cells generated an increase in ROS production and a decrease in TER of ~18% compared to the control condition. At the protein level, neither E-cadherin nor desmoplakin expression were affected by Cu treatment. However, ZO-1 and occludin expression were dramatically decreased. Similar results have been reported in Caco-2 cells (17, 16). Nevertheless, the impact on cell's TER was ~18% for HBE (Fig. 8A) and 95% for Caco-2 (17, 16). The *PrP* gene invalidation in HBE cells, however caused a decrease in TER of ~50% compared to the control condition (Fig. 4B and 8B) and an increase in the instability of tight (ZO-1 and occludin) and desmosomal (desmoglein and desmoplakin) protein junctions (Fig. 8E), highlighting the importance of PrP^C protein in oxidative protection of junctional proteins.

Through its interactions, PrP^C protein might ensure the stability and an oxidative stress protection for E-cadherin, γ -catenin, desmoplakin and desmoglein. The absence of such interactions might lead to the degradation of key junctional proteins, as was observed for ZO-1

and occludin. Previous studies, reported that in Caco-2 cells copper induced a concentration- and time-dependent decreases in the expression of tight junction proteins along with an increase in their permeability (17, 16). These effects might be explained by the absence of interaction between PrP^C and E-cadherin, as previously reported in these cells (42).

Altogether our results demonstrate that PrP^C protein by forming complexes with E-cadherin/ γ -catenin and desmoglein/plakoglobin proteins, participates in the regulation, the stability and the oxidative protection of adherens and desmosomal junctions in the bronchial cell barrier. Nevertheless, it is still to be demonstrated whether induction of PrP^C expression and its lateral localization are protective mechanisms during chronic airway diseases.

Innovation: (86 mots)

Chronic bronchial infection, inflammation and oxidative stress in pulmonary diseases such as cystic fibrosis lead to epithelial cell disorganization along with increased permeability. Yet, the mechanism by which this occurs is still to be determined. Here we brought evidences that the cellular prion is involved in the protection of the bronchial epithelial barrier upon oxidative stress occurrence. PrP^C protection of the lung epithelial barrier was exhibited through its capacity to interact and to stabilize adherens and desmosomal protein.

Experimental Procedures

Human tissues collection

Peripheral human lung tissue (containing non cartilaginous airways) was obtained at the time of lung transplantation from non-smoking controls undergoing lung resection upon peripheral lung cancer (Grenoble Hospital). Lung tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin by inflation-immersion and embedded in paraffin. Collection and processing of human lungs were conformed to the declaration of Helsinki and to all the rules of the local Committees on Human Research. Informed consent was obtained from each patient.

Mice tissues collection

For the *in vivo* experiments, mice (8–10-weeks old, 20–25 g) of C57BL/6 strains were used. Mice were obtained from the animal facility of CNRS (Orléans, France). The mice were randomly assigned to receive either distilled water, containing 50 ppm sucrose, or 250 ppm copper (copper sulfate (CuSO₄)) and 50 ppm sucrose.

All procedures involving animals and their care were approved by the local institutional Ethics Committee. Mice were sacrificed using cervical dislocation after chloral hydrate anesthesia. Fresh lungs were collected from each animal. Shortly after collection, tissues were fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature.

Immunohistochemistry

5 µm paraffin-embedded sections were prepared from human non-smoking peripheral lung tissues. Immunohistochemistry was performed as described previously (2). Sections were incubated with anti-PrP antibody (SAF32, Bertin-Pharma, France). Immunopositive staining was detected using a Vectastain ABC kit (Vector Labs) using DAB (3, 3'-diaminobenzidine) as the chromagen (Vector Labs). Slides were counterstained using hematoxylin (Sigma Aldrich, France). Immunohistochemistry was performed on lung sections collected from C57 mice as described previously (2). See Supplemental Experimental Procedures for details.

Cell culture

All culture media were purchased from Life-Technologies (France). The mouse neuroblastoma (N2a) and adenocarcinoma human alveolar basal epithelial (A549) cell lines were cultured in high glucose DMEM-Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) medium, whereas HBE cells were cultured in normal MEM (Modified Eagle's Medium) medium.

All media were supplemented with 10% fetal Bovine serum (Biowest, France) and 1% antibiotics mix (100 IU/ml of penicillin and 10 mg/ml streptomycin, Sigma). Cell cultures were performed at 37°C in a 5% CO₂/air atmosphere. Where indicated, cells were treated with vehicle or different concentrations of copper (Cu) for the indicated times.

siRNA knockdown of PrP^C and Transfection

The silencing PrP^C expression essay was performed following the protocol described in a previous report (26, 7). See Supplemental Experimental Procedures.

Cells lysates

For the steady state expression and endoglycosidase experiments, cells were washed twice with ice-cold phosphate buffer saline (PBS) and lysed at 4°C for 20 min in PBS containing 1% NP40, 0.5% deoxycholic acid, and 0.1% SDS added with protease inhibitors (10 mM PMSF, 1 µM leupeptin/pepstatin A and 1mg/ml of iodoacetamide). For proteinase K (PK) treatment, cells were lysed in PBS containing 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, pH 7.4. Protein concentrations were measured using the Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific, France).

Endoglycosidase and proteinase K (PK) digestion

To distinguish between high mannose and complex-type N-linked oligosaccharide modification of PrP^C, cell lysates were incubated with endoglycosidase H (H) and peptide N-glycosidase F (F) as previously reported (2). The mobility shift of deglycosylated PrP^C was visualized by immunoblotting using an anti-PrP mAb (SAF32). For PK treatment, cells lysates were incubated with 20µg/ml PK for 3h at 37°C, and the reaction was stopped by adding PMSF (3mM).

Immunoprecipitation, electrophoresis and immunoblotting

For immunoprecipitation assay, cells were lysed at 4°C for 30 min in PBS lysis solution containing 20 mM Tris HCl pH 8, 137 mM NaCl, 10% glycerol and 1% Nonidet P-40 (NP-40). Protein extracts were incubated 2 h with 1 µg/ml of anti-PrP^C antibody (SAF32) at 4°C, and immunoprecipitated with protein G-coupled sepharose beads (Sigma) for 2 h hours at 4°C. All protein samples were denatured for 5 min at 90°C in 2.5% SDS final concentration of Laemelli Sample Buffer (LBS), subjected to an SDS-PAGE (12%), transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad) and probed with corresponding primary antibodies. The following antibodies were used: mouse anti-E-cadherin (Ecad, Ozyme, France), anti-desmoglein (Deg, Covalab, France), anti-Ki-67 (DAKO, France), anti-Na⁺/K⁺-ATPase (Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa), and rabbit anti-ZO-1 (Fisher Sc., France), anti-γ-catenin (γ-cat, Abcam), anti-occludin (Occ, Sigma, France), anti-desmoplakin (Dep, Covalab, France). The antigen-antibody reaction was revealed using IgG antibody coupled to HRP (Covalab, France) and developed with ECL (Bio-Rad, France) using Fusion FX7 (Vilbert Lourmat).

Cell surface biotinylation

To determine the cell surface expression of PrP^C protein, HBE cells were selectively biotinylated as described previously (15). Biotinylated PrP^C protein was isolated by immunoprecipitation on Streptavidin-Sepharose (Sigma-Aldrich) and visualized by immunoblotting using anti-PrP mAb. The amount of biotinylated PrP^C relative to the control (time (t) = 0) was quantified by scanning the gel lanes followed by analysis with the Scion Image program (<http://www.scioncorp.com/pages>).

Immunofluorescence microscopy

The indirect immunofluorescence has been done as described previously (15). See Supplemental Experimental Procedures for details.

RNA isolation, RT, and real-time qPCR analysis

Total mRNA was extracted from cells and 1 μ g of the mRNA was reverse transcribed under conditions recommended by the manufacturer (Agilent technologies). The PCR was performed using the primers reported in Table 1 and GoTaq® qPCR Master Mix provided by Promega. Prion mRNA expression was quantified by real-time RT-qPCR using CFX96™ Real-Time detection system (Biorad).

Cell viability using MTT test

Cells were cultured in 96 wells plate upon confluency. Depending on experiment, 0-200 μ M CuSO₄ was added for 0-24 hours and followed by 4 h incubation in phenol red free medium containing 10% of MTT ([4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma). The MTT solution was replaced by MTT lysis solution (10% Triton X-100 and 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol), and the resulting optical density (DO) was determined after measurement of the difference between 570 nm and 690 nm absorbance.

Trans-epithelial resistance (TER) assay

Cells were seeded at confluency (day 0) on collagen-coated polycarbonate filters (Transwell-COL, Costar). TER was measured from day 1 to day 8 of cell culture using a Volt-Ohm Meter (Millipore, France).

Intracellular copper determination

To evaluate the intracellular copper concentration, control and PrP^C-knockdown HBE cells were collected and stored at RT. Samples were vacuum-dried and mineralized in 70% nitric acid before analysis with Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) with a Varian, Vista MPX instrument. The copper content (μ g) was reported relatively to the number of cells (10^6).

ROS Measurements

Normal and PrP^C siRNA knockdown HBE cells (10^6 cells/well) were seeded in a 24-well plate and cultured for 24 h. The cells were washed and changed to serum-free media and incubated with 50 μ M of 5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (H₂DCFDA, Invitrogen, France) for 45 min. The conversion of H₂DCFDA to fluorescent DCF was measured using a plate reader Infinite M200 (TECAN, France).

Statistical analysis

Statistical comparisons were made using Student's t-test analysis. Calculations were performed using SigmaStat (Jandel Scientific Software, SanRafael, CA).

Acknowledgments

We thank the staff of the Department of Medicine, Respiratory Division, (Pr. C. Pison) at the Hospital of Grenoble (CHU) for allowing access to human lung tissues.

We acknowledge the following sources of funding: CNRS (LCBM-UMR 5249), INSERM (U1036), UJF, and CEA/DSV/BIG), and VLM (Vaincre la Mucoviscidose, France). AK, is a fellowship from AGIR program (University of Grenoble). SC and JC are fellowships from VLM (Vaincre la mucoviscidose, France)

Author Disclosure Statement

There is no conflict of interest.

List of Abbreviations

Cu: Copper

DCF: dichlorofluorescein

16HBE14o- (HBE): Human Bronchial Epithelial cells

GPI: Glycosyl Phosphatidyl Inositol

CF: Cystic fibrosis

PrP^C: Cellular Prion Protein

ROS: Reactive Oxygen Species

References

1. Aguzzi A, Baumann F, Bremer J. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 31: 439-77, 2008.
2. Alfaidy N, Chauvet S, Donadio-Andrei S, Salomon A, Saoudi Y, Richaud P, Aude-Garcia C, Hoffmann P, Andrieux A, Moulis JM, Feige JJ, Benharouga M. Prion protein expression and functional importance in developmental angiogenesis: role in oxidative stress and copper homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 18: 400-11, 2013.
3. Arkhipenko A, Syan S, Victoria GS, Lebreton S, Zurzolo C. PrPC Undergoes Basal to Apical Transcytosis in Polarized Epithelial MDCK Cells. *PLoS One* 11: e0157991, 2016.
4. Baker RD, Baker SS, LaRosa K. Polarized Caco-2 cells. Effect of reactive oxygen metabolites on enterocyte barrier function. *Dig Dis Sci* 40: 510-8, 1995.
5. Banan A, Fields JZ, Zhang Y, Keshavarzian A. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1234-46, 2001.
6. Besnier LS, Cardot P, Da Rocha B, Simon A, Loew D, Klein C, Riveau B, Lacasa M, Clair C, Rousset M, Thenet S. The cellular prion protein PrPc is a partner of the Wnt pathway in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 26: 3313-28, 2015.
7. Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, Salomon A, Schaal JP, Feige JJ, Alfaidy N. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 21: 2832-43, 2010.
8. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-7, 1997.
9. Buschmann A, Kuczius T, Bodemer W, Groschup MH. Cellular prion proteins of mammalian species display an intrinsic partial proteinase K resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 693-702, 1998.
10. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros* 14: 419-30, 2015.
11. Castle AR, Gill AC. Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci* 4: 19, 2017.
12. Christensen HM, Harris DA. A deleted prion protein that is neurotoxic in vivo is localized normally in cultured cells. *J Neurochem* 108: 44-56, 2009.
13. Collinge J. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Human Molecular Genetics* 6: 1699-1705, 1997.
14. Cozens AL, Yezzi MJ, Yamaya M, Steiger D, Wagner JA, Garber SS, Chin L, Simon EM, Cutting GR, Gardner P. A transformed human epithelial cell line that retains tight junctions post crisis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association* 28A: 735-744, 1992.
15. De Keukeleire B, Donadio S, Micoud J, Lechardeur D, Benharouga M. Human cellular prion protein hPrPC is sorted to the apical membrane of epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354: 949-954, 2007.
16. Ferruzza S, Scacchi M, Scarino ML, Sambuy Y. Iron and copper alter tight junction permeability in human intestinal Caco-2 cells by distinct mechanisms. *Toxicol In Vitro* 16: 399-404, 2002.
17. Ferruzza S, Scarino ML, Rotilio G, Ciriolo MR, Santaroni P, Muda AO, Sambuy Y. Copper treatment alters the permeability of tight junctions in cultured human intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol* 277: G1138-48, 1999.
18. Forbes B, Shah A, Martin GP, Lansley AB. The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o-as a model system of the airways for studying drug transport. *International Journal of Pharmaceutics* 257: 161-167, 2003.

19. Geys J, Coenegrachts L, Vercammen J, Engelborghs Y, Nemmar A, Nemery B, Hoet PH. In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: a preliminary study. *Toxicol Lett* 160: 218-26, 2006.
20. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417-23, 1973.
21. Gomes MP, Millen TA, Ferreira PS, e Silva NL, Vieira TC, Almeida MS, Silva JL, Cordeiro Y. Prion protein complexed to N2a cellular RNAs through its N-terminal domain forms aggregates and is toxic to murine neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 283: 19616-25, 2008.
22. Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L, Reyes JL. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int* 57: 2386-402, 2000.
23. Grumbach Y, Quynh NV, Chiron R, Urbach V. LXA4 stimulates ZO-1 expression and transepithelial electrical resistance in human airway epithelial (16HBE14o-) cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L101-8, 2009.
24. Harris DA. Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* 12: 429-44, 1999.
25. Hiemstra PS, McCray PB, Jr., Bals R. The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *Eur Respir J* 45: 1150-62, 2015.
26. Hoffmann P, Saudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N. Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med* 13: 2224-35, 2009.
27. Hu W, Kieseier B, Frohman E, Eagar TN, Rosenberg RN, Hartung HP, Stuve O. Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. *J Neurol Sci* 264: 1-8, 2008.
28. Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19: 4687-93, 2008.
29. John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Signal* 15: 1255-70, 2011.
30. Johnson LN, Koval M. Cross-talk between pulmonary injury, oxidant stress, and gap junctional communication. *Antioxid Redox Signal* 11: 355-67, 2009.
31. Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid J, Chen L, Villemaire M, Ali Z, Jirik FR, Zamponi GW. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol* 181: 551-65, 2008.
32. Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 417-22, 2005.
33. Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 8: 432-46, 2003.
34. Knust E, Bossinger O. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 298: 1955-9, 2002.
35. Kohler K, Louvard D, Zahraoui A. Rab13 regulates PKA signaling during tight junction assembly. *J Cell Biol* 165: 175-80, 2004.
36. Lechuga S, Ivanov AI. Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1864: 1183-1194, 2017.
37. Llorens F, Ansoleaga B, Garcia-Esparcia P, Zafar S, Grau-Rivera O, Lopez-Gonzalez I, Blanco R, Carmona M, Yague J, Nos C, Del Rio JA, Gelpi E, Zerr I, Ferrer I. PrP mRNA and protein expression in brain and PrP(c) in CSF in Creutzfeldt-Jakob disease MM1 and VV2. *Prion* 7: 383-93, 2013.
38. MacNee W, Rahman I. Oxidants/antioxidants in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 50 Suppl 1: S53-8, 1995.
39. Mishra RS, Basu S, Gu Y, Luo X, Zou W-Q, Mishra R, Li R, Chen SG, Gambetti P, Fujioka H, Singh N. Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-

- 2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24: 11280-11290, 2004.
40. Mittal M, Thiruvengkatachari B, Sandler PJ, Benson PE. A three-dimensional comparison of torque achieved with a preadjusted edgewise appliance using a Roth or MBT prescription. *Angle Orthod* 85: 292-7, 2015.
41. Mo GW, Cai SX, Zhao HJ, Li WJ, Tong WC, Liu LY. [Effect of toluene diisocyanate on reactive oxygen species production and permeability of human bronchial epithelial cells in vitro]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 31: 239-43, 2011.
42. Morel E, Fouquet S, Chateau D, Yvernault L, Frobert Y, Pinçon-Raymond M, Chambaz J, Pillot T, Rousset M. The cellular prion protein PrP^c is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 1499-1505, 2004.
43. Morel E, Fouquet S, Strup-Perrot C, Thievend CP, Petit C, Loew D, Faussat A-M, Yvernault L, Pinçon-Raymond M, Chambaz J, Rousset M, Thenet S, Clair C. The Cellular Prion Protein PrP^c Is Involved in the Proliferation of Epithelial Cells and in the Distribution of Junction-Associated Proteins. *PLoS ONE* 3: e3000, 2008.
44. Nawijn MC, Hackett TL, Postma DS, van Oosterhout AJ, Heijink IH. E-cadherin: gatekeeper of airway mucosa and allergic sensitization. *Trends Immunol* 32: 248-55, 2011.
45. Paquet S, Sabuncu E, Delaunay J-L, Laude H, Vilette D. Prion Infection of Epithelial Rov Cells Is a Polarized Event. *Journal of Virology* 78: 7148-7152, 2004.
46. Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* 273: 33107-10, 1998.
47. Petit CS, Besnier L, Morel E, Rousset M, Thenet S. Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function. *Tissue Barriers* 1: e24377, 2013.
48. Provansal M, Roche S, Pastore M, Casanova D, Belondrade M, Alais S, Leblanc P, Windl O, Lehmann S. Proteomic consequences of expression and pathological conversion of the prion protein in inducible neuroblastoma N2a cells. *Prion* 4: 292-301, 2010.
49. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-22, 1991.
50. Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 3: 726-33, 2006.
51. Puig B, Altmeyden HC, Thurm D, Geissen M, Conrad C, Bräulke T, Glatzel M. N-glycans and glycosylphosphatidylinositol-anchor act on polarized sorting of mouse PrP(C) in Madin-Darby canine kidney cells. *PLoS One* 6: e24624, 2011.
52. Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, Arlotto M, Riondel J, Laude H, Lehmann S, Favier A. Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. *J Biol Chem* 278: 9064-72, 2003.
53. Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A, Holycross M. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 273: G812-23, 1997.
54. Rezaee F, Meednu N, Emo JA, Saatian B, Chapman TJ, Naydenov NG, De Benedetto A, Beck LA, Ivanov AI, Georas SN. Polyinosinic:polycytidylic acid induces protein kinase D-dependent disassembly of apical junctions and barrier dysfunction in airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 128: 1216-1224 e11, 2011.
55. Sarnataro D, Paladino S, Campana V, Grassi J, Nitsch L, Zurzolo C. PrP^c is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic* 3: 810-21, 2002.
56. Sussan TE, Gajghate S, Chatterjee S, Mandke P, McCormick S, Sudini K, Kumar S, Breyse PN, Diette GB, Sidhaye VK, Biswal S. Nrf2 reduces allergic asthma in mice through enhanced airway epithelial cytoprotective function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309: L27-36, 2015.

57. Uelhoff A, Tatzelt J, Aguzzi A, Winklhofer KF, Haass C. A pathogenic PrP mutation and doppel interfere with polarized sorting of the prion protein. *J Biol Chem* 280: 5137-40, 2005.
58. Villegas L, Stidham T, Nozik-Grayck E. Oxidative Stress and Therapeutic Development in Lung Diseases. *J Pulm Respir Med* 4, 2014.
59. Vivekananda J, Lin A, Coalson JJ, King RJ. Acute inflammatory injury in the lung precipitated by oxidant stress induces fibroblasts to synthesize and release transforming growth factor-alpha. *J Biol Chem* 269: 25057-61, 1994.
60. Zeng F, Watt NT, Walmsley AR, Hooper NM. Tethering the N-terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *J Neurochem* 84: 480-90, 2003.

Figure legends

Figure 1: Steady state expression and characterization of PrP^C protein in human bronchial epithelial cells (HBE).

(A) RT-qPCR of PrP^C mRNA in HTR, N2a, A549 and HBE cells. (B) The expression levels of PrP^C mRNAs were quantified by real-time RT-qPCR, normalized to the 18S levels. Data are expressed as mean \pm SE (n=4). (C) Immunoblot detection of PrP^C in protein extracts from N2a, HTR, A549 and HBE cells. (D) Endoglycosidase H (H) and N-glycosidase F (F) digestion profiles of PrP^C protein. (E) PrP^C digestion with 20 μ g/ml of proteinase K (PK) for 1 hour at 37°C. (C, D, E) Equal amounts of protein extracts from the indicated cell lines were separated on 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted using the monoclonal anti-PrP antibody (SAF32). The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms are indicated, respectively, by black, gray, and white arrowheads.

Figure 2: Localization of PrP^C protein in human bronchial epithelial tissue and cells.

(A) Immunolocalization of PrP^C using mAb anti-PrP (SAF32) in human bronchial tissue (b). (a) Negative controls. Asterisks in panels (b) show the strongest sites of PrP^C immunoreactivity. Bl, bronchial lumen, BEC, bronchial epithelial cells. (B-E) Immunofluorescence labeling of PrP^C (green, MAb anti-PrP) and nuclei (bleu, Hoechst) was performed after 3 or 10 days of HBE culture, (C and E) X/Z projections were reconstructed from horizontal optical sections of labeled cells at 3 and 10 days of confluency. ap, apical, bl, basolateral.

Figure 3: Colocalization of PrP^C protein with different proteins of the junctional barrier in polarized HBE cells.

(A) Co-immunofluorescence labeling of PrP^C, zona occludens-1 (ZO-1), γ -catenin (γ -Cat), E-cadherin (Eca), desmoplakin (Dep), desmoglein (Des) and nuclei (blue, Hoechst) was performed in polarized HBE cells at day 10 of culture. (B) X/Z projections were reconstructed from horizontal optical section of labeled HBE cells at 10 days confluency. ap, apical, bl, basolateral. (C) Co-immunofluorescence labeling of PrP^C, Ki-67 protein and nuclei (blue, Hoechst) was performed in polarized HBE cells at day 10 of culture.

Figure 4: Interaction profiles and role of PrP^C protein in bronchial epithelial barrier.

(A) PrP^C was immunoprecipitated (IP) using anti-PrP mAb (SAF32) and protein G coupled to sepharose. The eluted proteins were subjected to immunoblots (IB) using anti-PrP, anti-ZO-1, anti- γ -Cat (γ -Catenin) anti-Ecad (E-cadherin), anti-desmoplakin (Dsp) or anti-desmoglein (Deg). IN: input (10% of the protein extract before immunoprecipitation). The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms are indicated, respectively, by black, gray, and

white arrowheads. **(B)** Trans-epithelial resistance (TER) measurement in control (●) and PrP^C-knockdown HBE cells (Δ). Cells were seeded at confluency (day 0) on collagen-coated polycarbonate filters and TER was assessed daily for 8 days. **(C)** TER values measured after 8 days of culture were plotted for the control (-) and PrP^C-knockdown (+) HBE cells. Values overwritten with stars are significantly different from the control ($p < 0.05$).

Figure 5: Copper treatment increases PrP^C expression in HBE cells.

(A, D) HBE cells were treated with copper sulfate in a dose (μM) and time (h) dependent manner and cell lysates were subjected to immunoblots using anti-PrP (SAF32) or anti-Na⁺/K⁺-ATPase antibody. The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms are indicated, respectively, by black, white, and gray arrowheads. **(B)** ImageJ quantification of the expression of the three glycosylation forms of PrP^C protein standardized to Na⁺/K⁺-ATPase expression in HBE cells. **(C, E)** Following copper treatment, PrP^C mRNAs expression levels were quantified by real-time RT-PCR, normalized to the 18S levels and plotted as function of incubation time (h) and concentration (μM). A.U: arbitrary unit. Data are expressed as mean \pm SE (n=6). Values overwritten with stars are significantly different from the control (0 h) ($P < 0.05$).

Figure 6: Copper treatment stimulates lateral membrane insertion of PrP^C protein.

(A) Detection of biotinylated PrP^C protein in HBE cells extract before (lysate, lys) and after biotinylation (biot) was achieved after 24h stimulation (+) of HBE cells with 100 μM of copper. PrP^C was covalently labelled with NHS-SS-biotin at 4°C. Biotinylated (biot) PrP^C was affinity-isolated on streptavidin (strep) beads and immunoblotted with anti-PrP mAb (SAF32). Neither intermediate- (I, white arrowheads) nor unglycosylated (U, gray arrowheads) forms were susceptible to biotinylation. **(B)** Biotinylated high-glycosylated form of PrP^C quantified using Image J was plotted as function of copper stimulation. Data are expressed as mean \pm SE (n=3). Values with asterisk are significantly different from the control (0 h) ($P < 0.05$). **(C)** Immunofluorescence detection of PrP^C (green, MAb anti-PrP) in polarized HBE cells (10 days of culture) was performed following 24 h copper stimulation under non- and permeabilized conditions. ap, apical, bl, basolateral. X/Y and X/Z projections were reconstructed from horizontal optical sections. After 10 days of culture, nuclei were stained using Hoechst. **(D)** Lateral fluorescence labeling of HBE X/Z projection detected after 24 h copper treatment in non- and in permeabilized HBE cells (X/Z projection) was quantified using Image J and plotted as function of copper stimulation. Data are expressed as mean \pm SE (n=3). Values with asterisk are significantly different from the control (-) ($P < 0.05$).

Figure 7: Depletion of PrP^C in HBE cells enhances Cu-induced ROS accumulation, increases cell Cu content and causes acute cell death.

(A, C) Control or PrP-knockdown HBE cells (siPrP^C) were incubated in the absence or the presence of Cu for the indicated times. Cells were trypsinized and harvested. Dead cells were assessed by trypan blue staining and MTT assays. For Fig. 7C, 100 μ M of Cu was used. (B, E) ICP-AES determination of Cu content in HBE cells under basal and following 24 h stimulation with Cu of wt and PrP^C depleted HBE cells (siPrP^C). For Fig. 7E, 100 μ M of copper was used. (D) HBE or PrP-knockdown HBE cells (siPrP^C) were incubated with 50 μ M DCFH-DA for 45 min. Cells were then incubated with or without 100 μ M of Cu at 37°C for 2 h. DCF fluorescence was determined at an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 538 nm by a microplate reader. Data are expressed as mean \pm SE (n=6). Values with an asterisk are significantly different from the corresponding control (P < 0.05).

Figure 8: PrP^C protects adherent and desmosome proteins from oxidative-associated degradation.

(A) Trans-epithelial resistance (TER) measurement in control (Δ) and in the presence of 100 μ M of copper (\blacktriangle) for the indicated time. Cells were seeded at confluency (day 0) on collagen-coated polycarbonate filters and TER was assessed daily for 5 days. (B) TER values measured after 4 days of culture were plotted for the control (-) and PrP^C-knockdown (+) HBE cells. Values overwritten with stars are significantly different from the control (p < 0.05).

(C) Steady state expression of tight (ZO-1 and occludin (Occ)), adherent (γ -catenin (γ -Cat) and E-cadherin (E-Cad)) and desmosome (desmoplakin (Dep)) junctional proteins following 100 μ M copper treatment for the indicated times. Proteins were detected using the indicated antibodies. Anti-Na/K-ATPase was used as a loading control. The high- (H), intermediate- (I), and unglycosylated (U) forms of PrP^C protein are indicated, respectively, by black, gray, and white arrowheads.

(D) Degradation rate of ZO-1 and occludin (Occ) using cycloheximide (CHX) assays. For the indicated times, HBE cells were incubated in the presence of 100 μ g/ml of CHX and in the absence (-) or presence (+) of 100 μ M of copper. Protein extracts were separated on SDS-PAGE gels and proteins of interest were detected using anti-ZO-1 and anti-occludin antibodies.

(E) Degradation rate of ZO-1, occludin (Occ), desmoplakin (Dep) and desmoglein (Deg) in PrP^C-knockdown HBE cells (si-PrP) using cycloheximide (CHX) assays. For the indicated times, si-PrP HBE cells were incubated in the presence of 100 μ g/ml of CHX and in the absence (-) or presence (+) of 100 μ M of copper. Proteins extract were separated on SDS-PAGE gels

and proteins of interest were detected using anti-ZO-1, anti-occludin, and-desmoplakin and anti-desmoglein antibodies.

Supplemental Experimental Procedures and Legends:

Supplemental Experimental Procedures

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on lung sections collected from C57 mice. Fresh lung tissues were collected from each animal, snap-frozen into liquid nitrogen, and sliced (5 μm) using a cryomicrotome cryostat. For PrP^C detection, sections were incubated with the anti-PrP^C antibodies (SAF32, Bertin-Pharma, France). Immunopositive staining was detected using a Vectastain ABC kit (Vector Labs), using DAB as the chromogen (Vector Labs). Slides were counterstained using hematoxylin and eosin (H&E) (Sigma Aldrich, France).

siRNA knockdown of PrP^C and Transfection

Control small interfering RNAs (scrambled siRNA), which is a pool of several control siRNAs, and siRNA oligonucleotides duplexes specific for human PrP^C were purchased from Ambion (life-technology). The siRNA sequences (5-CAGCAAATAACCATTTGGTTAA-3) to inhibit PrP^C mRNA synthesis have dTdT overhanging at their 21 terminus. Transfection of siRNA was carried out using Silencer siRNA Transfection II Kit (Ambion, life-technology). Transfections were performed for 72 h, and the transfected cells were washed and their mRNA or proteins extracted and subjected, respectively, to real-time RT-qPCR or Western blot analysis.

Immunofluorescence microscopy

Cells were washed twice with PBS containing 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂, and fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde at 4°C. After an extensive wash in 150 mM glycine in PBS (PBS-glycine), the cells were permeabilized by incubation for 5 min in 0.1% Triton X-100 in PBS and washed in PBS-glycine followed by PBS plus 1% BSA. Cells were then incubated for 60 min at room temperature (RT) with the indicated primary antibodies in PBS supplemented with 1% BSA. The reaction was visualized using Alexa-488 (Green) or Alexa-546 (Red)-conjugated goat anti-mouse antibodies. For actin and nucleus staining, cells were incubated respectively with Alexa Fluor phalloidin (Thermo Fisher Sc., France) or DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindol, Sigma, France). After extensive wash in PBS, cells were mounted in mounting medium (Sigma, France) and fluorescence micrographs were obtained with a Zeiss LSM 510 laser confocal fluorescence microscope. Confocal images were scanned using a 0.6-0.9- μm pinhole and the multitrack scanning mode.

Figures Legends of Supplementary figures

Figure S1: Trans-epithelial resistance (TER), expression and localization of PrP^C and junctional proteins in A549 cells.

(A) TER measurement in HBE and A549 cells. HBE and A549 cells were seeded at a density of 20,000 cells/cm² on HTS 24-Transwell® filter plates. The changes in the TER were measured every day for 10 days, and the reported results corresponded to the values obtained at days 10. Each data point represents the mean ± SD (n=12 for A549 and HBE).

(B) PrP^C colocalization with E-cadherin (E-cad), γ -catenin (γ -Cat) and desmoplakin (Dep) in A549 cells.

(C) X/Z projections were reconstructed from horizontal optical section of labelled A549 cells at 10 days confluency.

Figure S2: PrP^C knockdown in HBE cells.

(A, B) PrP^C knockdown using two specific siRNA. 24 h after transfection, mRNA and proteins were isolated and quantified by RT-qPCR (A) and by western blot (B).

Figure S3: Localization of PrP^C protein in mice bronchial epithelial tissue.

Immunolocalization of PrP^C using mAb anti-PrP (SAF32) in mice bronchial tissue. (a) Negative controls. Asterisks in panels (c) and (d) show the strongest sites of PrP^C immunoreactivity. Bl, bronchial lumen, BEC, bronchial epithelial cells.

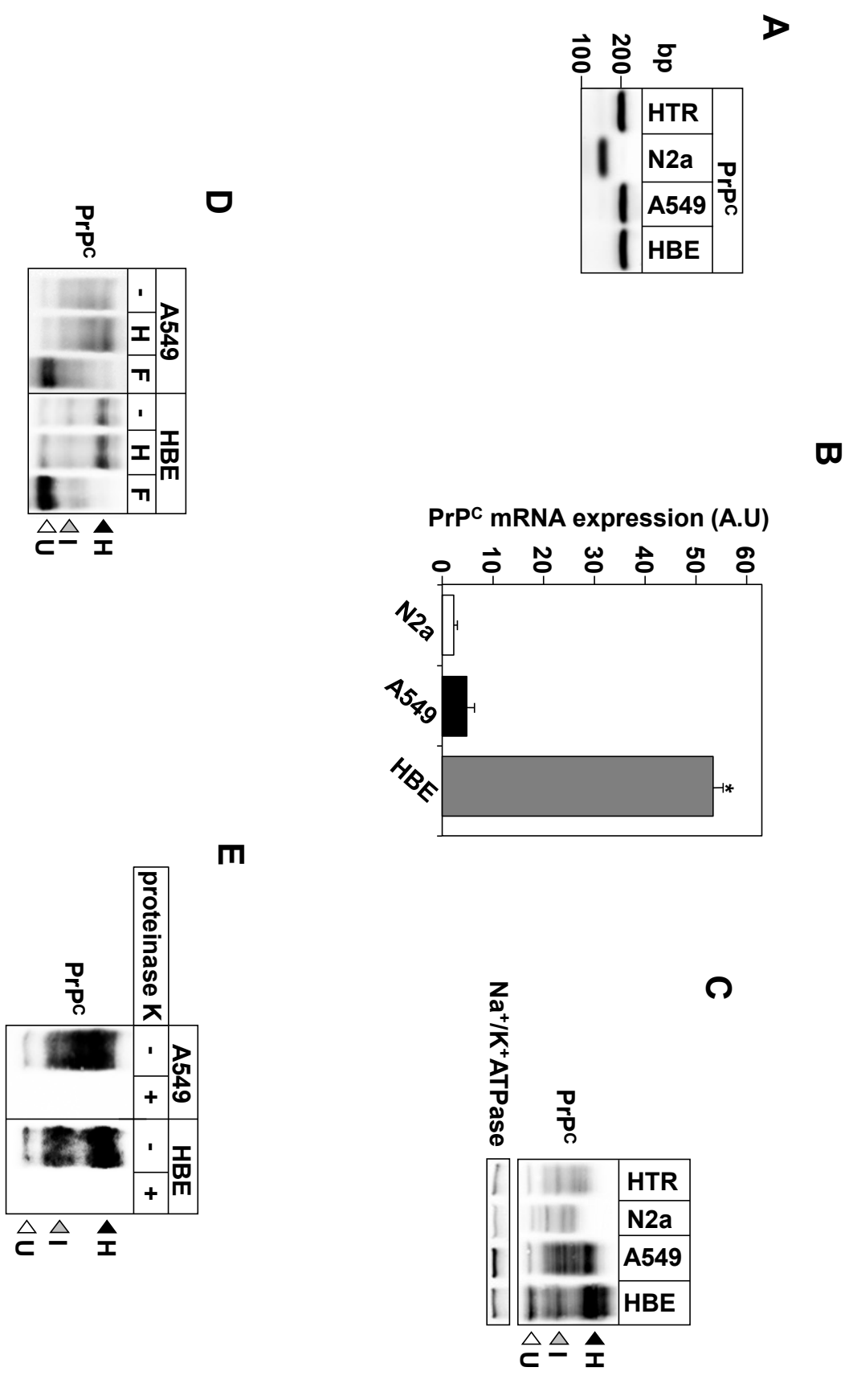


Figure 1

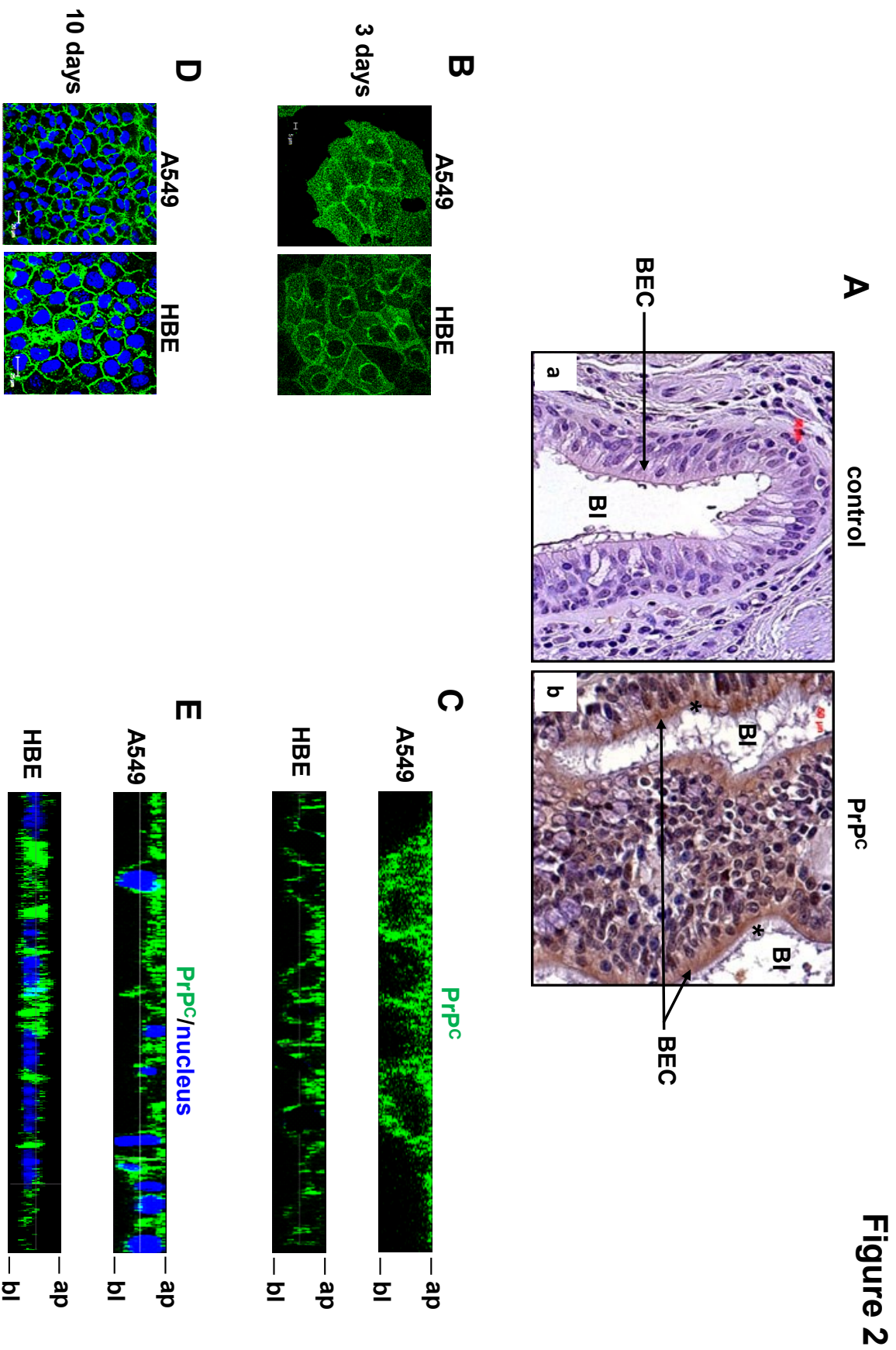


Figure 2

Figure 3

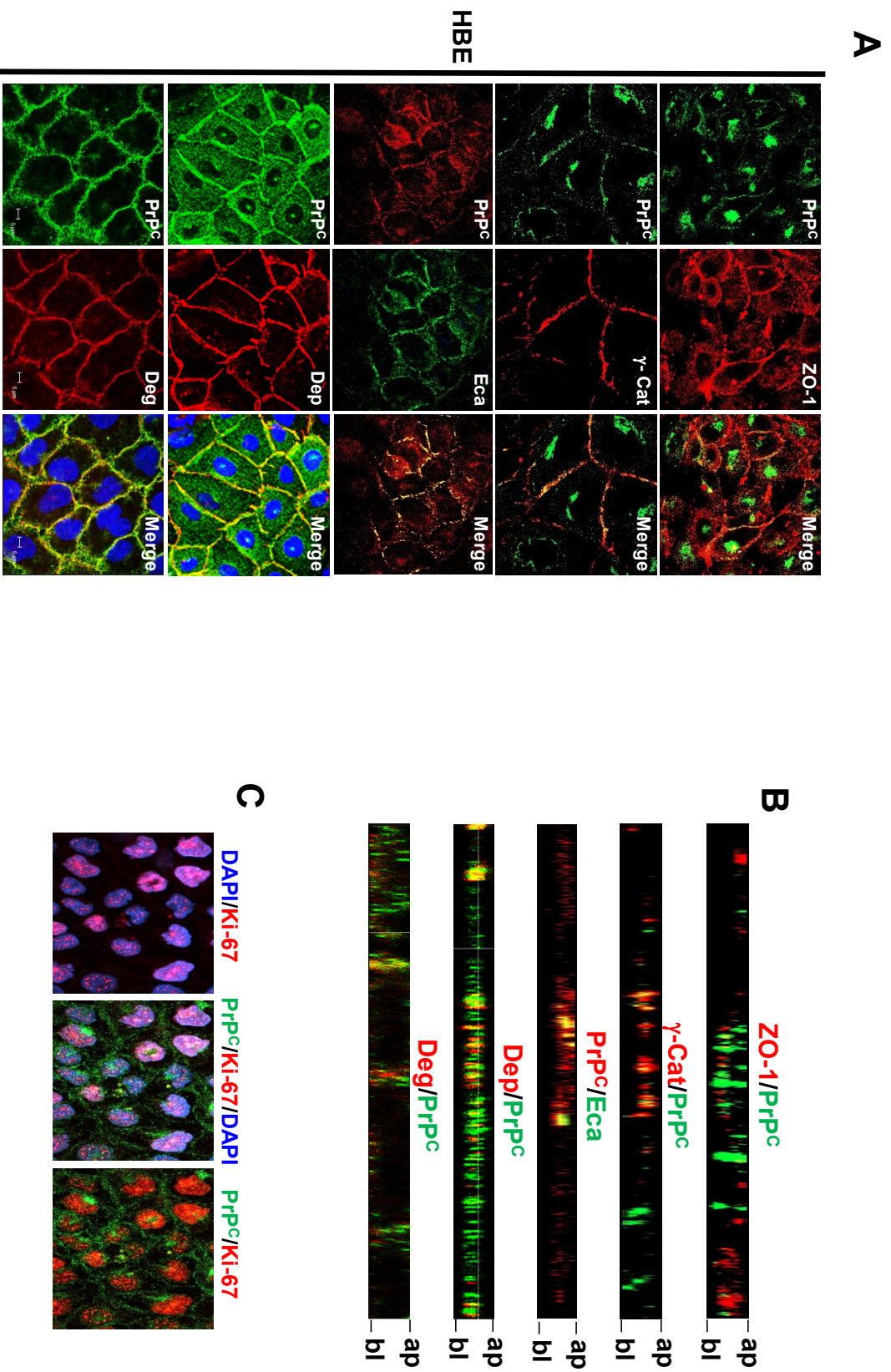


Figure 4

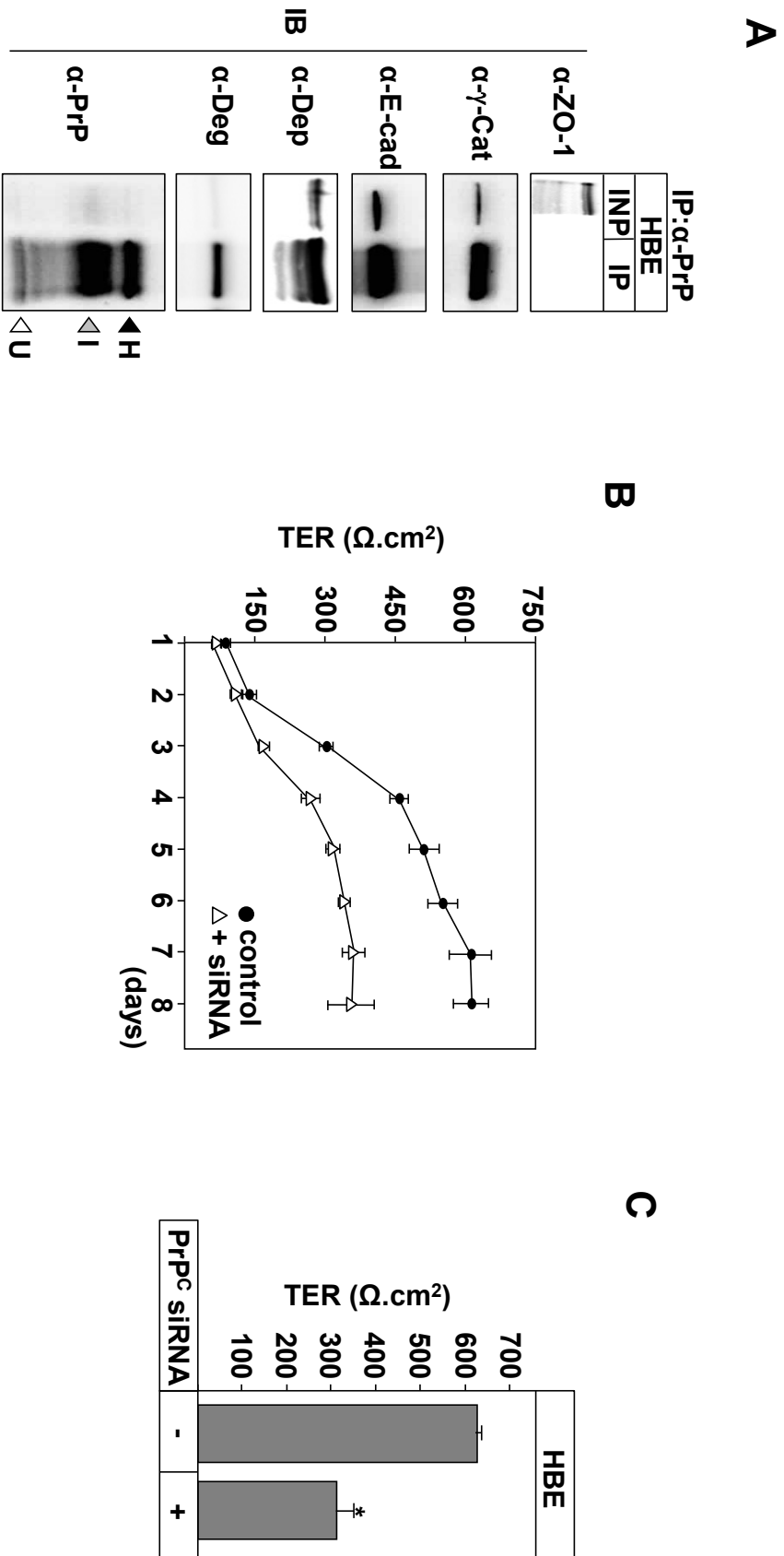


Figure 5

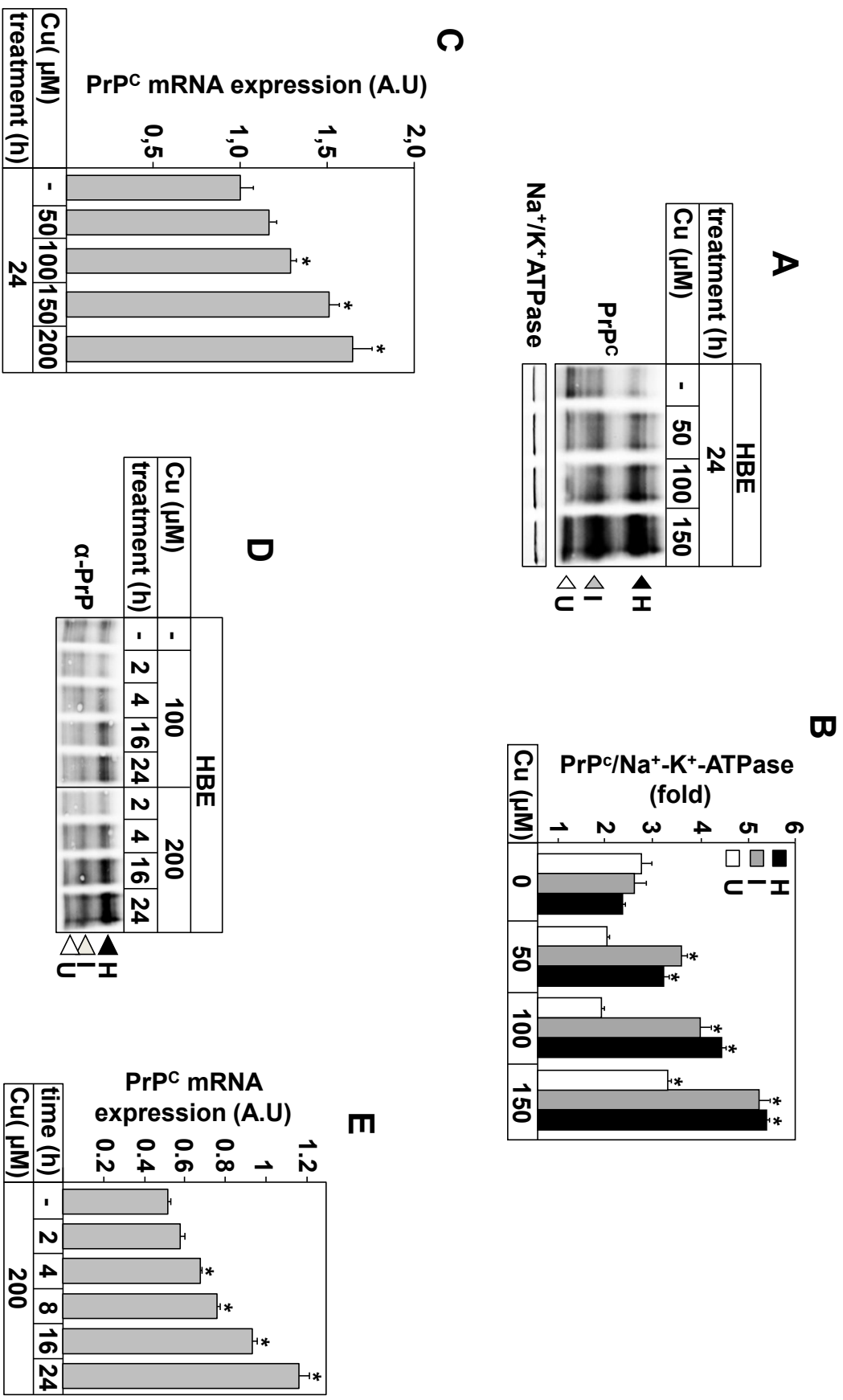
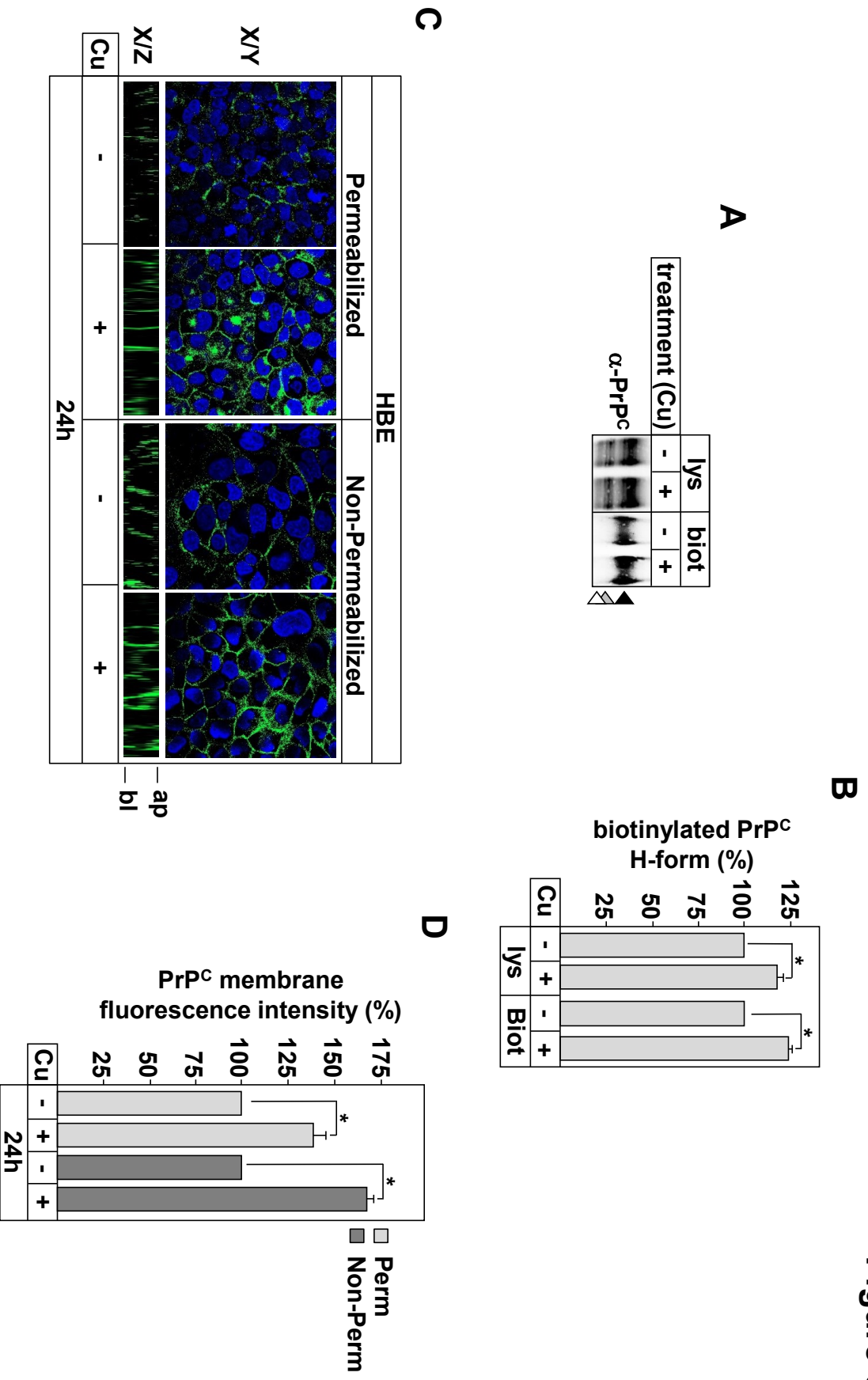


Figure 6



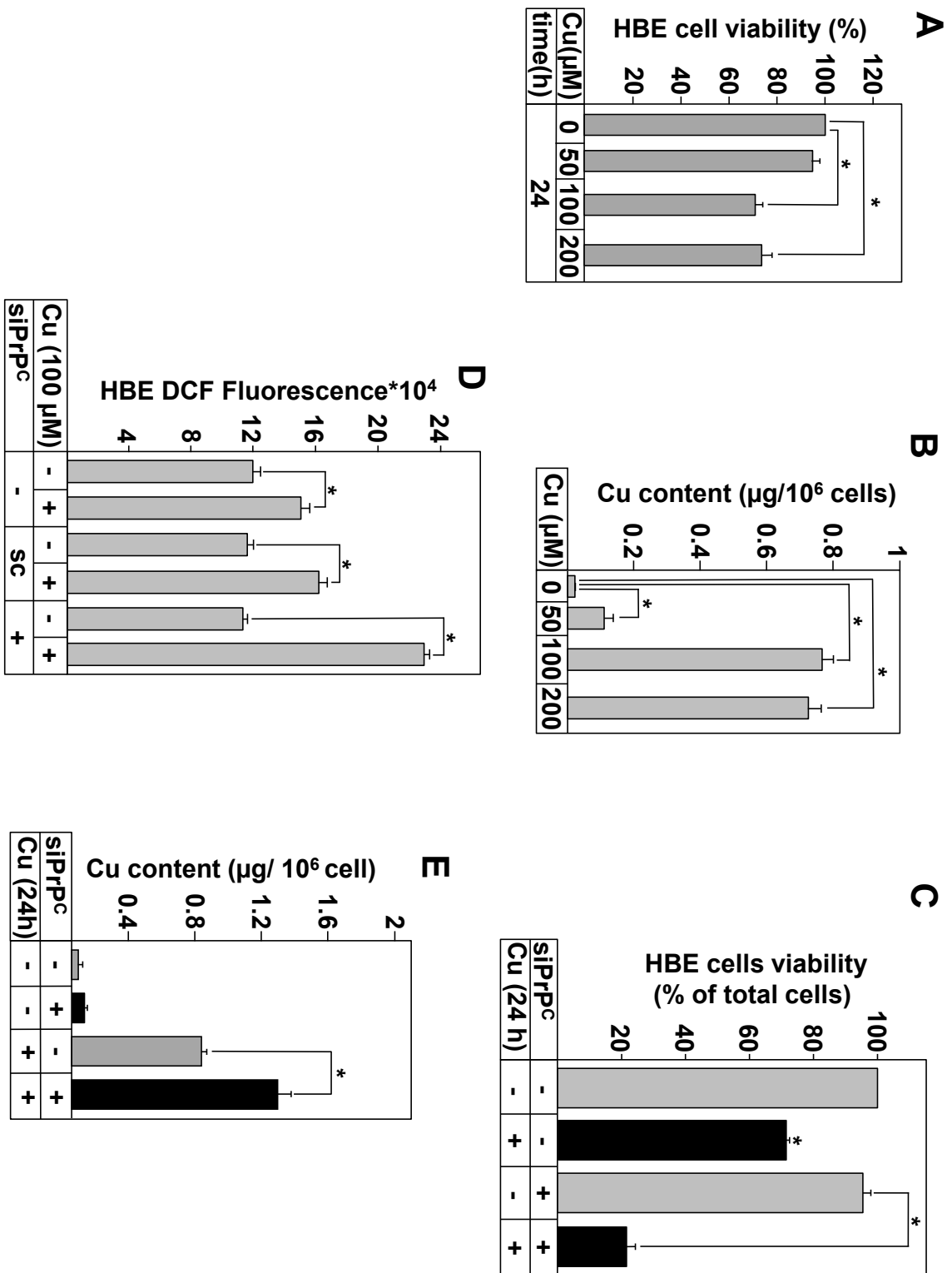


Figure 7

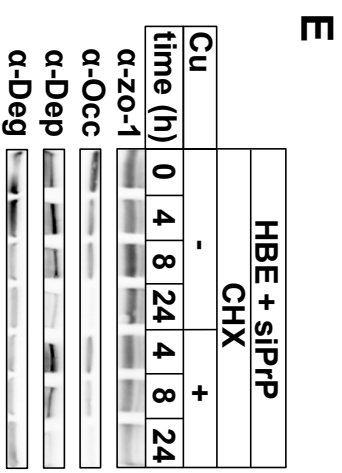
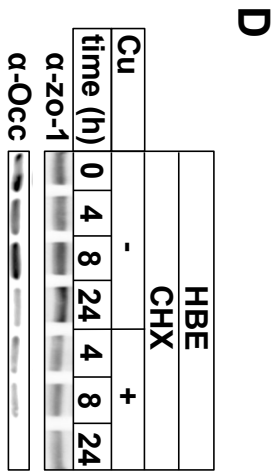
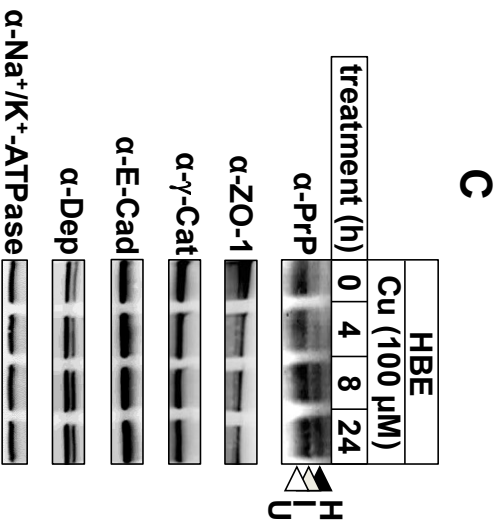
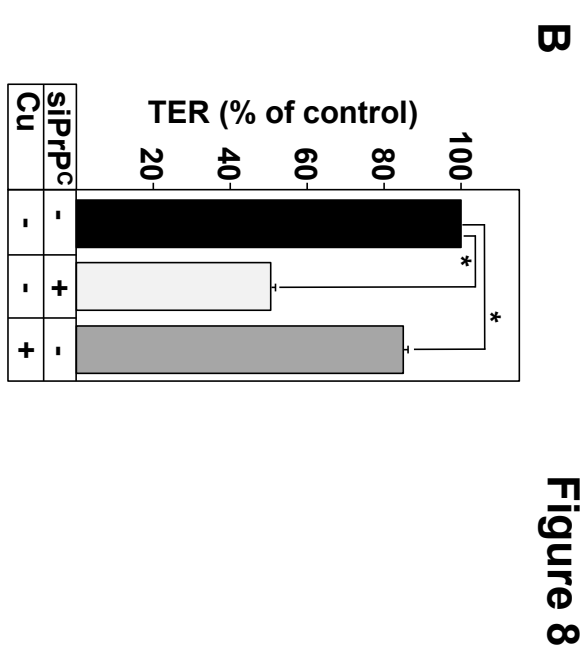
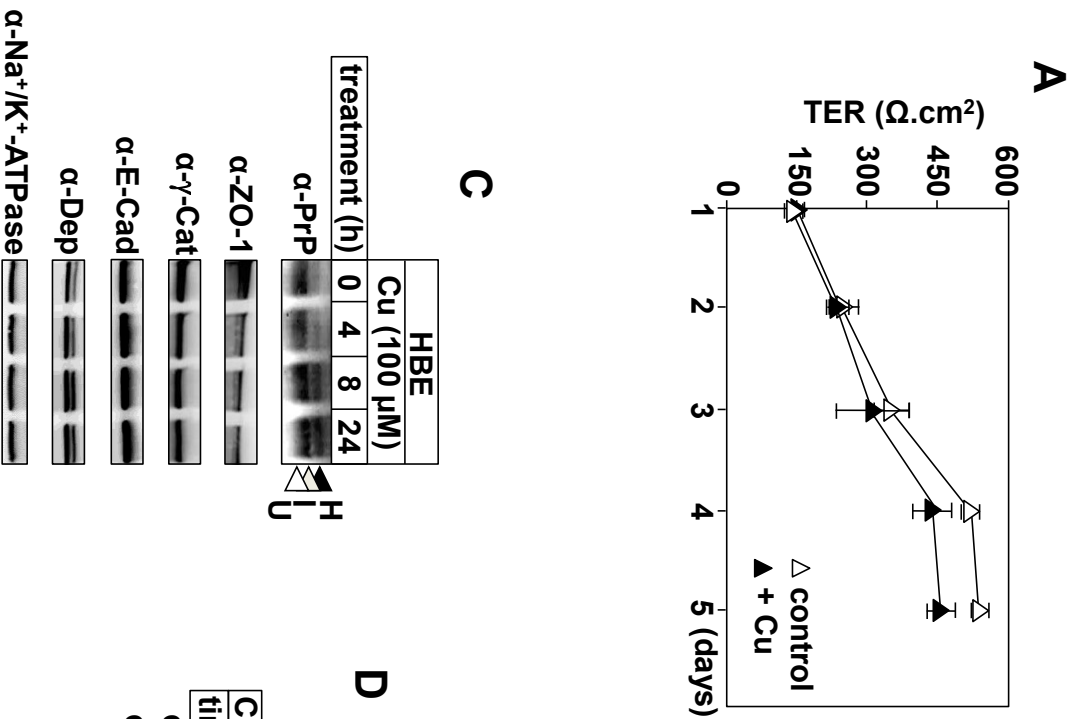


Figure 1S

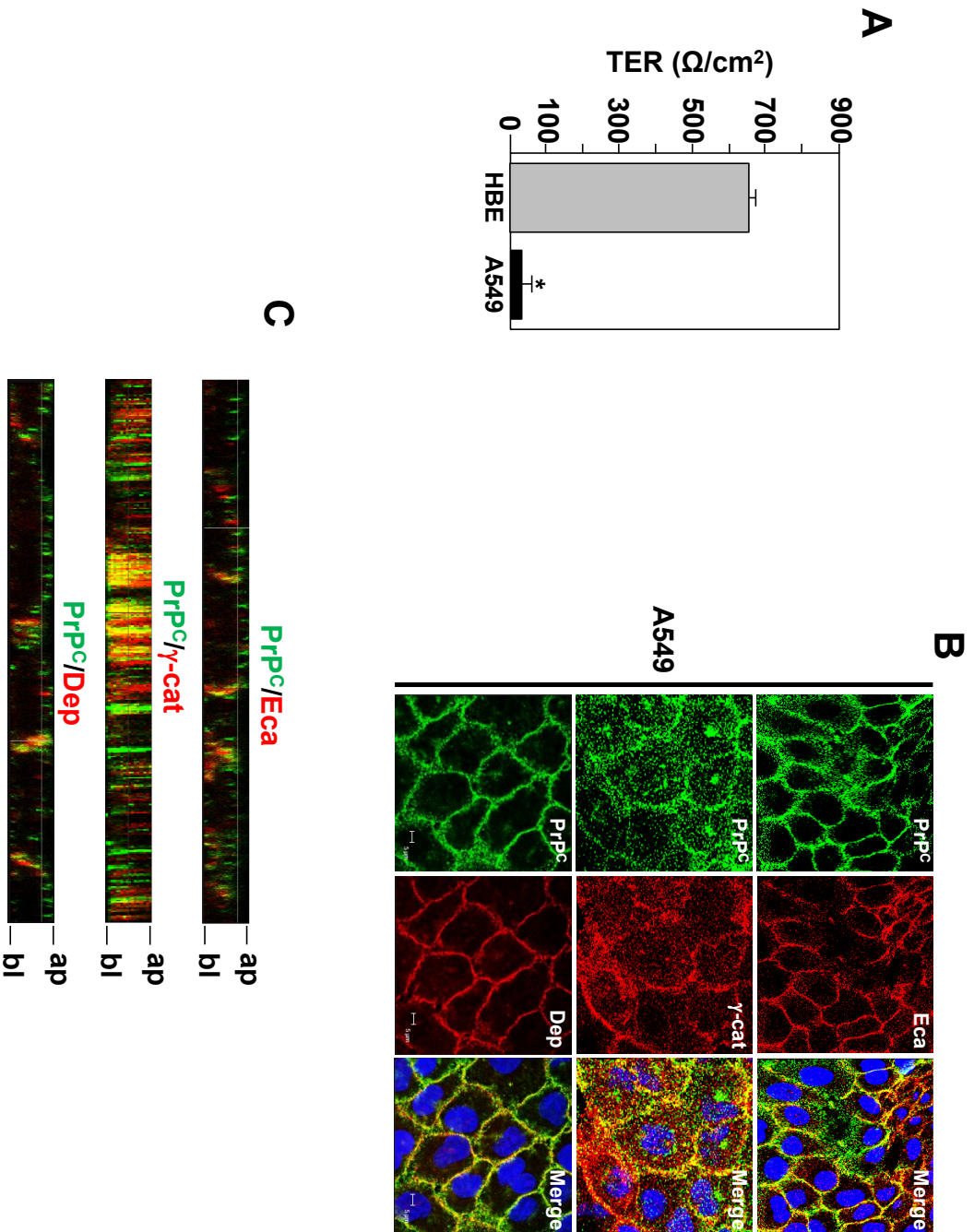
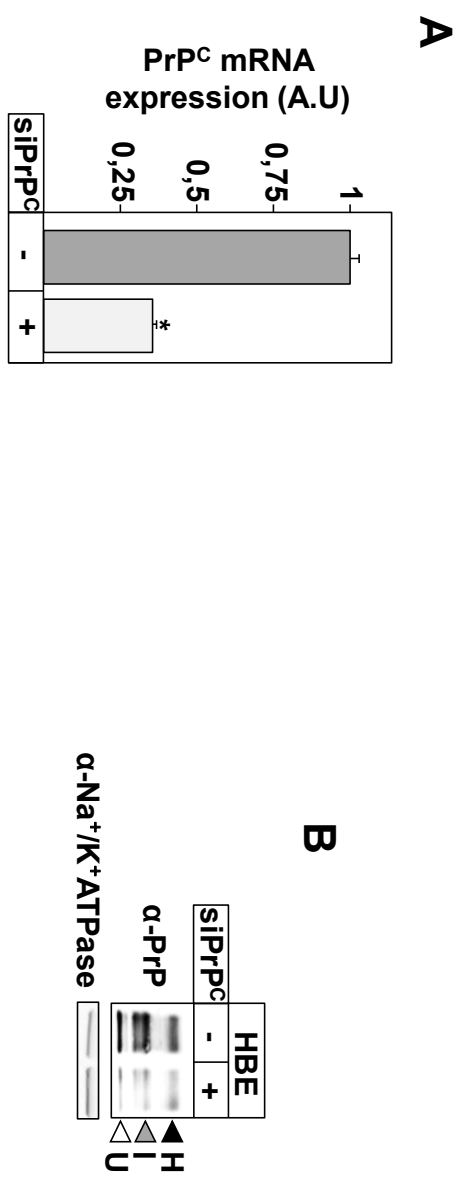


Figure 2S



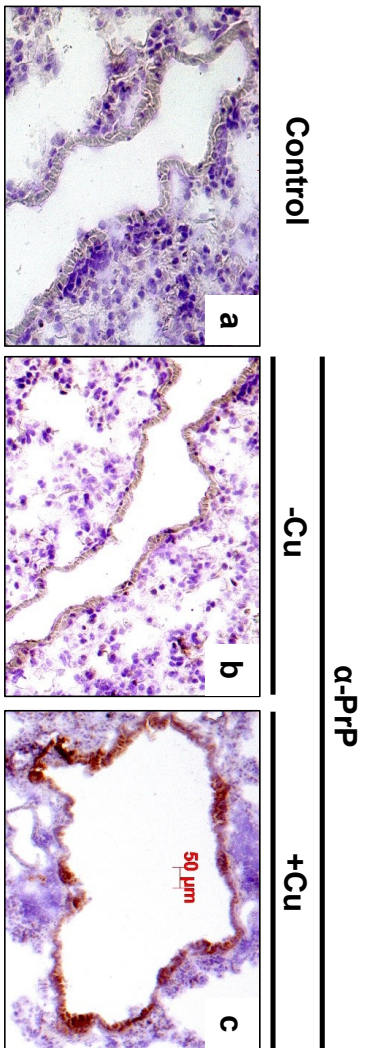


Figure 3S

3.2 Discussion et perspective

Nos études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, réalisées chez la souris et chez l'homme, ont démontré que la protéine PrP^c est exprimée dans les cellules épithéliales bronchiques. Nos résultats prouvent que la protéine PrP^c est bien exprimée dans les cellules HBE et A549 et qu'elle est totalement digérée par la protéinase K, indiquant par-là que la protéine PrP^c détectée dans les cellules épithéliales pulmonaires a une conformation normale. Les profils d'expression de glycosylation et de digestion de PrP^c détectés dans les lignées cellulaires A549 et HBE sont similaires à ceux rapportés dans les cellules épithéliales intestinales et les cellules trophoblastiques placentaires [333]. De façon intéressante, et comme précédemment observé dans les cellules placentaires, le traitement des cellules HBE avec le Cu a augmenté l'insertion de PrP^c à la membrane plasmique, suggérant un rôle potentiel de cette protéine comme un senseur et/ou chélateur de Cu à la surface cellulaire. Ce phénomène protégerait les cellules contre une intoxication cuprique. Alors qu'au niveau neuronal, c'est plutôt une augmentation de l'endocytose du PrP^c qui a été observée à la suite d'un traitement au Cu.

Ces résultats laissent supposer que la protéine PrP^c aurait un rôle particulier dans les cellules de l'épithélium pulmonaire [358]. Après traitement par le cuivre, nous avons observé une augmentation de la concentration intracellulaire de cet oligoélément et de la production des ROS. L'invalidation de l'expression du PrP^c par RNA interférence (ARNi) et un traitement par le Cu dans les cellules HBE ont affecté la viabilité, la concentration cellulaire en Cu, et la production de ROS, confirmant ainsi le rôle protecteur de PrP^c dans les cellules pulmonaires. Un des mécanismes de protection possible est que la PrP^c pourrait moduler l'activité des enzymes antioxydantes afin de réguler les niveaux des ROS. Néanmoins, un rôle direct du PrP^c dans la protection contre le stress oxydatif reste encore à établir. La localisation cellulaire de PrP^c pourrait aussi jouer un rôle important dans la protection contre un excès de Cu et donc contre la surproduction des ROS et ses effets néfastes sur la fonction cellulaire. Ainsi, nous avons démontré que le tissu pulmonaire humain sain exprimait fortement la protéine PrP^c à la membrane des cellules bronchiques. Ces résultats amènent à supposer que PrP^c joue un rôle dans le contrôle de la barrière des tissus pulmonaires.

Au niveau cellulaire, nous avons démontré que la localisation de PrP^c était liée au degré de polarisation des HBE. Au cours de la mise en place des barrières jonctionnelles, la PrP^c était localisée au niveau apical et latéral dans les cellules HBE et A549 ; après 10 jours de polarisation la localisation de PrP^c s'était limitée au côté latéral dans les cellules HBE, alors qu'aucune modification n'était observée dans les A549.

Nos résultats prouvent que la distribution du PrP^c dépend de la formation des jonctions cellulaires et que la distribution de PrP^c dans les cellules épithéliales bronchiques est contrôlée par le degré de polarisation de ces cellules. La différence dans les niveaux de la résistance trans-épithéliale ((RTE), un indicateur de l'intégrité de la barrière jonctionnelle), et les niveaux d'expression de PrP^c dans les cellules HBE et A549 a révélé, pour la première fois, l'existence d'une relation entre les niveaux de RTE et la localisation et expression de PrP^c. Cependant, l'origine des A549 (adénocarcinomes) et des HBE (cellules transformées) pourrait influencer le niveau d'expression de PrP^c. Or cela ne semble pas être le cas car l'expression d'autres protéines qui sont également impliquées dans les jonctions cellulaires, telles que l'E-cadhérine, la β -caténine et la plakoglobine, ne présentaient aucune modification ni de leur niveau d'expression ni de leur localisation cellulaire par rapport aux HBE. Les résultats de colocalisation suggèrent un nouveau rôle de PrP^c dans les jonctions cellulaires, en particulier dans les desmosomes et jonctions adhérentes. Nous avons démontré que PrP^c interagit avec l'E-cadhérine (jonction adhérente) et la desmoglénine (jonction des desmosomes), deux protéines transmembranaires présentant des partenaires cytoplasmiques : respectivement, la β -caténine et la plakoglobine. L'implication de la protéine PrP^c dans la régulation de l'E-cadhérine et dans l'organisation des desmosomes a été renforcée par les résultats de son invalidation qui réduit les niveaux de RTE d'environ 50%, une indication forte de l'implication de cette protéine dans la fonction des complexes jonctionnels.

Globalement, nos résultats suggèrent fortement que la protéine PrP^c serait susceptible de former des complexes avec les protéines des jonctions adhérentes et des desmosomes. Ces complexes pourraient jouer des rôles spécifiques dans la régulation et le contrôle des voies de signalisations liées à la barrière bronchique et à la protection cellulaire. En conclusion, nous avons démontré que la protéine prion cellulaire normale peut avoir un double rôle dans les cellules épithéliales bronchiques. D'une part, PrP^c agit comme un protecteur contre le stress induit par le cuivre dans les cellules pulmonaires bronchiques. D'autre part, à travers sa relocalisation, elle est susceptible de participer à l'établissement et à la fonction des barrières jonctionnelles, premières lignes de protection contre les agents pathogènes et les particules exogènes dans les pathologies respiratoires.

IV

Conclusions et Perspectives

Pour mon projet de thèse, je suis partie de l'hypothèse que la dérégulation de la réponse au stress oxydatif associée à la maladie de la mucoviscidose pourrait participer au déclenchement et à l'installation de l'inflammation précoce observée au niveau bronchique chez les patients mucoviscidosiques. Il faut rappeler que ce sont les mutations identifiées au niveau du gène CFTR qui sont à l'origine soit de l'absence de la protéine CFTR fonctionnelle au niveau de la membrane plasmique (mutation delF508), soit de l'absence de la sécrétion des ions chlorures (Cl⁻) à travers un canal CFTR membranaire (mutation G551D). Dans les deux cas, la protéine CFTR pourrait être impliquée, directement ou indirectement, dans l'apparition du stress oxydant et de l'inflammation associée à la mucoviscidose.

Plusieurs études ont montré la présence d'un état de stress oxydant et d'une inflammation exacerbés dans les cellules de l'épithélium pulmonaire mucoviscidosique. Cependant, les résultats disponibles à ce jour ne permettent pas d'impliquer les dérégulations de la protéine CFTR dans ces deux manifestations. De plus, comment le stress oxydatif pourrait déclencher une réponse inflammatoire dans les cellules épithéliales bronchiques reste encore une énigme.

Une des raisons qui rendent souvent contradictoires les résultats obtenus et compliquent les conclusions que l'on peut tirer sur l'implication du CFTR dans ces deux processus est probablement la multiplicité des modèles utilisés (lignées primaires ou immortalisées, d'origine pulmonaire ou intestinale, humaine ou murine, etc.) et la diversité des approches expérimentales utilisées.

C'est pourquoi dans ce projet nous avons, dans un premier temps, caractérisé de la manière la plus complète possible l'état inflammatoire et oxydatif de lignées cellulaires bronchiques, saines et mucoviscidosiques. L'implication de CFTR et/ou de son activité dans ces deux processus a été évaluée dans des cellules isogéniques (même fond génétique) : CFBE et CFBE-wt.

Nous avons caractérisé la réponse inflammatoire dans ces mêmes lignées cellulaires en les comparant à la lignée HBE (cellules bronchiques humaines saines). Nous avons confirmé la présence de la réponse inflammatoire et montré que pour certaines cytokines, comme l'IL-8, l'absence de détection dans le milieu n'est pas associée à un défaut de production, mais plutôt à une diminution de sa sécrétion, ce qui suggère la présence d'un défaut d'exocytose cellulaire dans les cellules mucoviscidosiques.

Pour évaluer l'implication de CFTR dans cette réponse inflammatoire, nous avons utilisé i) des cellules CFBE corrigées pour l'expression de la protéine CFTR sauvage

(CFBE-wt), ii) des molécules correctrices de l'adressage intracellulaire du CFTR-delF508 et iii) une molécule capable d'inhiber spécifiquement l'activité du CFTR (le inh-172). Nos résultats montrent que le processus inflammatoire est partiellement corrigé par le rétablissement de l'expression et de la fonction du CFTR sauvage et par le traitement au miglustat (molécule correctrice de l'adressage du CFTR-delF508).

Nous avons par la suite montré que dans les cellules CFBE il existe un état de stress oxydant caractérisé par une production importante de ROS. Ainsi, nous avons cherché à caractériser la source intracellulaire du stress oxydant dans les cellules CFBE en les comparant aux cellules HBE et CFBE-wt.

Nous avons démontré que l'état du stress associé à la mucoviscidose résulte de plusieurs sources de stress intracellulaire. Dans les cellules CFBE, il existe à la fois un stress mitochondrial et un stress réticulaire (réticulum endoplasmique). Aussi, nous avons observé une diminution de la capacité antioxydante des cellules mucoviscidosiques caractérisée par une diminution de l'activité des enzymes Cu/Zn-SOD et Mn-SOD. Dans cette partie, nous avons montré que l'état du stress oxydatif est indépendant de l'expression et de l'activité du CFTR, à l'exception du stress réticulaire qui lui est dépendant de cette protéine. Par ailleurs, nous avons montré que l'induction d'un état de stress oxydant provoque une réponse inflammatoire exagérée dans les cellules HBE, suggérant que, dans la mucoviscidose le stress oxydant pourrait constituer un facteur déclenchant de l'inflammation précoce.

Au cours de l'évaluation des différentes sources du stress oxydant dans les cellules CFBE, nous avons mis en évidence la présence d'une dérégulation de l'homéostasie de trois métaux de transition importants pour la fonction cellulaire : le fer (Fe), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu). Le métal qui nous a le plus intéressés est le cuivre. En effet, dans les cellules mucoviscidosiques, l'activité de l'enzyme Cu/Zn-SOD est diminuée, la production du glutathion par la mitochondrie, un chélateur intracellulaire du cuivre, est diminuée, et l'activité mitochondriale qui dépend en partie du cuivre comme donneur d'électron pour la chaîne respiratoire est aussi diminuée. De plus, chez les patients atteints de mucoviscidose, l'homéostasie systémique et broncho-alvéolaire du cuivre est dérégulée.

L'ensemble de ces résultats et observations nous ont incité à explorer l'homéostasie du cuivre dans les cellules bronchiques humaines saines et mucoviscidosiques, en relation avec la protéine CFTR (figure ci-dessous 0.1).

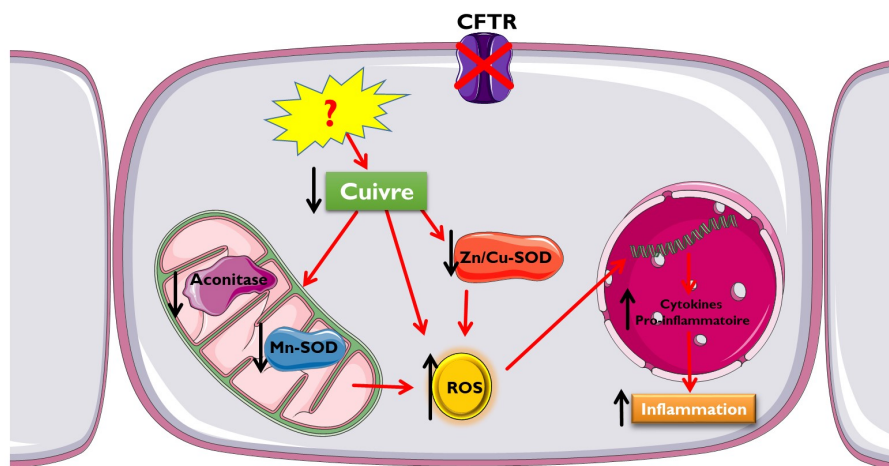


Figure 0.1: Schéma récapitulatif partie I

En évaluant l'expression transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des différentes protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre, nous avons observé que l'expression de la protéine prion cellulaire (PrP^c) était augmentée dans les cellules CFBE en comparaison avec les cellules HBE (résultats non montrés). Nous avons par la suite confirmé ces résultats sur des extraits d'ARNm et de protéines préparées à partir d'échantillons de bronches humaines saines et mucoviscidiques collectées dans le service de transplantation du CHU de Grenoble (Pr. Pison).

La protéine PrP^c est une glycoprotéine de la famille des GPI. Cette protéine a été très étudiée, en raison de l'implication de sa forme pathogène (forme scrapie : PrP^{sc}) dans les maladies neurodégénératives connues sous le nom des maladies à prion. Cependant, son rôle physiologique reste encore à caractériser.

La protéine PrP^c est capable de chélater le cuivre et de protéger les cellules contre les dommages oxydatifs en adoptant une activité SOD-like, ou en favorisant l'incorporation du cuivre dans l'enzyme Cu/Zn-SOD. La protéine PrP^c interagit également avec plusieurs protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et participe au maintien des jonctions intercellulaires au niveau de la barrière intestinale. L'expression du PrP^c est aussi modulée par le stress cuprique.

L'ensemble de ces paramètres régulés par la protéine PrP^c sont altérés dans la mucoviscidose, faisant de la PrP^c une protéine candidate idéale à étudier dans le contexte de

la mucoviscidose. En dépit d'une richesse bibliographique très importante concernant l'implication de la protéine PrP^c dans différentes fonctions du système nerveux central (SNC) et extra-SNC, il n'y a aucune donnée quant à son expression, sa régulation et son rôle dans les cellules épithéliales bronchiques humaines. Ainsi, j'ai entrepris la caractérisation de l'expression et de la régulation de la protéine PrP^c dans les cellules bronchiques humaines, déterminé sa localisation et sa distribution cellulaire et tissulaire et étudié son rôle dans la protection de la barrière jonctionnelle contre le stress oxydatif, d'origine cuprique. Pour la première fois nous avons démontré que la protéine PrP^c est exprimée dans les cellules de l'épithélium bronchique humain sain, que son expression est augmentée par le cuivre au niveau membranaire et que cette augmentation joue un rôle dans la protection des cellules contre le stress oxydatif d'origine cuprique. Ce rôle a été confirmé après l'invalidation de l'expression de la PrP^c.

Nous avons par la suite démontré que la protéine PrP^c présente une localisation dépendante du niveau de polarisation des cellules bronchiques. La localisation est apicale et devient latérale au fur et à mesure que les jonctions cellulaires se mettent en place. Au niveau latéral, la protéine PrP^c interagit avec la E-cadhérine (protéine des jonctions adhérentes) et la desmogléine (protéine des jonctions desmosomes) suggérant que la protéine PrP^c joue un rôle important dans les jonctions cellulaires. L'invalidation de l'expression du PrP^c confirme son importance dans le maintien de ces jonctions cellulaires.

Puis, nous avons par la suite démontré que l'augmentation de l'expression du PrP^c suite à un stress cuprique est exclusivement latérale et que son rôle est de stabiliser les protéines des jonctions adhérentes et desmosomes. Cependant, aucune co-localisation ni interaction n'a été observée avec la protéine ZO-1 (protéine des jonctions serrées). En conclusion, nous avons démontré que la protéine prion cellulaire normale a un double rôle dans les cellules épithéliales bronchiques. Elle agit comme un protecteur du stress induit par le cuivre dans les cellules pulmonaires bronchiques. À travers sa relocalisation, elle pourrait participer à l'établissement et à la fonction des barrières jonctionnelles, premières lignes de défense contre les agents pathogènes et les particules exogènes dans les pathologies respiratoires (Figure ci-dessous 0.2).

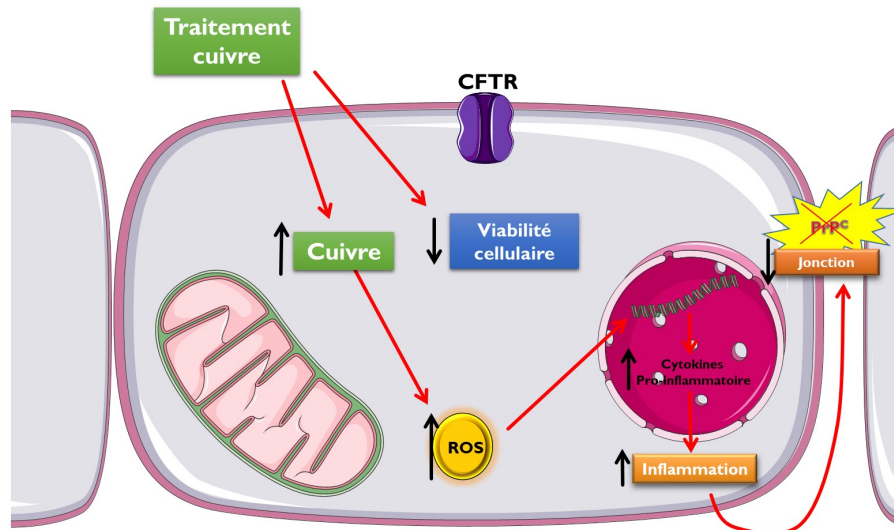


Figure 0.2: Schéma récapitulatif partie II

Au cours de la réalisation du travail sur la caractérisation du rôle de la protéine PrP^c dans les cellules bronchiques humaines, nous avons été limités dans nos investigations par le niveau d'inactivation de l'expression du PrP^c par la méthode d'ARN interférents. C'est pourquoi j'ai entrepris la mise en place de la technique CRISPR/Cas9. Nous avons réussi à obtenir une lignée HBE-KO pour la protéine PrP^c. Ces résultats nous laissent entrevoir d'énormes perspectives pour la suite de notre projet. Nous disposons, pour la première fois d'une lignée isogénique bronchique humaine n'exprimant plus la protéine PrP^c. Cette lignée nous permettra d'infirmer ou de confirmer nos résultats concernant le rôle de la protéine PrP^c dans les cellules bronchiques, d'identifier les liens potentiels entre la protéine prion et la protéine CFTR et d'explorer son rôle dans la mucoviscidose.

V

Annexes

Amal KOUADRI

19 Rue Antoine Chantin 75014 Paris – France
06 12 40 79 61 - kouadri.amal@gmail.com

PhD student in Biology
Expert in Biochemistry/Molecular Biology



EDUCATION

2014 – 2017: Ph.D. in Biology

University Grenoble Alpes (UGA)

French Alternative Energies and Atomic Energy Commission (CEA) Grenoble, FRANCE



2012 – 2014: Master of Science and Technology, Specialty Biochemistry and Molecular Biology

Biology and Pharmacology of aging

University Pierre & Marie Curie (UPMC), Paris, FRANCE



PROFESSIONAL EXPERIENCE

2014 - 2017: Ph.D. Under the direction of Dr Mohamed Benharouga,

« *Involvement of the cellular prion protein PrP^C in chronic pulmonary inflammation? Role of copper homeostasis and oxidative stress.* »

LCBM-UMR5249, CEA.



January 2014 – July 2014: Internship, under the direction of Dr Batiste Boeda,

« *Analysis of polarity control and cell migration by SCRIB tumor suppressor* »

Pasteur Institute, Team cell polarity, migration and cancer,

Department of cellular biology and infection, Paris, FRANCE



July-August 2012: Internship INRA (National Institute of Agricultural Research)

« *Molecular virology of fishes* »

Unit of Virology and Molecular Immunology, Jouy-en-Josas, FRANCE



SKILLS

Conception, organization and planning of projects

Management of students and **team work**.

Management of technical resources and equipment.

Technical skills:

Cellular biology: cell culture, immuno(cyto & histo)chemistry, migration and cell invasion, transfection, cytotoxicity test, viral particles productions, FACS, Ussing chamber.

Biochemistry: immunoblotting, immunoprecipitation, ELISA.

Molecular Biology: cloning, quantitative RT-PCR, CRISPR/Cas9

Microscopy: optical and confocal microscopy

Animal experimentation: Certificate of animal experimentation animal level 1 & 2

Linguistic skills and software

Proficient with Office suites (MS Office, OpenOffice), \LaTeX and professional software such as pDRAW32, imageJ– GraphPad –Zotero

Native French, fluent in oral and written English, beginner in Japanese Certificate of completion beginner level at genki Japanese and cultural school obtained in Japan

Publications:

1. « *EG-VEGF, BV8 and their receptors expression in human bronchi and their modification in cystic fibrosis: impact of CFTR mutation (delF508)* »

Chauvet S, Traboulsi W, Thevenon L, **Kouadri A**, Feige JJ, Camara B, Alfaidy N, Benharouga M., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2015**, 309(3):L314-L322.

2. « *The Cellular Prion Protein Expression and Functional Importance in Human Bronchial Epithelia: Role in Stress-Protective Signaling and Junctional Barrier* »

Kouadri A, El kathib M, Traboulsi W, Chauvet S, Richaud P, Coraux C, Michaud-Soret I, Alfaidy N and Benharouga M. (on going).

3. « *Inflammatory profile of F508del cystic fibrosis bronchial epithelial cells following the recovery of CFTR function: Correctors versus gene expression* »

Kouadri A, Cormenier J, Michaud-Soret I, Alfaidy N and Benharouga M. (on going).

Oral communications and posters:

2017:

- **February** *Inflammatory response of F508del CF bronchial epithelial cells following the recovery of CFTR function: correctors versus gene expression* – oral communication and poster -

Kouadri A., El Khatib M., Chauvet S., Charbonnier P., Michaud-Soret I., Alfaidy N. and Benharouga M.

Cystic Fibrosis European Young Investigator Meeting, Paris (France).

- **February** *Inflammatory response of F508del CF bronchial epithelial cells following the recovery of CFTR function: correctors versus gene expression* – oral communication and poster -

Kouadri A., El Khatib M., Chauvet S., Charbonnier P., Michaud-Soret I., Alfaidy N. and Benharouga M.

Young Scientists Conference « Vaincre la mucoviscidose », Paris (France).

2016:

- **October** *Characterization of the cellular prion protein in chronic inflammation in relation with copper and oxidative stress: the case of cystic fibrosis* – oral communication and poster -

Kouadri A., El Khatib M., Chauvet S., Charbonnier P., Michaud-Soret I., Alfaidy N. and Benharouga M.

“Journée scientifique du pôle chimie biologie santé », Grenoble (France)

- **June** *The cellular prion protein (PrP^C) is involved in the lung epithelial junctional barrier* – poster-

El Khatib M., **Kouadri A.**, Macari L., Michaud-Soret I., Alfaidy N. and Benharouga M.

Annual Meeting of the Doctoral School of Chemistry and Life Sciences, Grenoble, France.

- **February** *The effect of gene and pharmacological correction of mutated CFTR (del508F) on inflammation in human bronchial epithelial cells* –poster-

Kouadri A., El Khatib M., Chauvet S., Charbonnier P., Michaud-Soret I., Alfaidy N. and Benharouga M.

Young Scientists Conference « Vaincre la mucoviscidose », Paris (France).

2015:

- **September** *The cellular prion protein (PrP^C) is involved in the lung epithelial junctional barrier.* – oral communication and poster -

El Khatib M., **Kouadri A.**, Macari L., Michaud-Soret I., Alfaidy N. and Benharouga M.

6th International IMBG Meeting & Advanced Courses, Villard de Lans (France).

- **June** *The cellular prion protein (PrP^C) is involved in the lung epithelial junctional barrier.* –poster-

El Khatib M., **Kouadri A.**, Macari L., Michaud-Soret I., Alfaidy N. and Benharouga M

Medical Research Day, Grenoble (France).

- **February** *The cellular prion protein (PrP^C) is involved in the lung epithelial junctional barrier.* – oral communication and poster-

El Khatib M., **Kouadri A.**, Macari L., Michaud-Soret I., Alfaidy N. and Benharouga M

Young Scientists Conference « Vaincre la mucoviscidose », Paris (France).

REFERENCES

Dr. Mohamed Benharouga,
Thesis advisor
LCBM-UMR5249 DRF-BIG, CEA-Grenoble
Email: mohamed.benharouga@cea.fr
Phone: 04-38-78-44-51

Dr. Batiste Boeda
Master advisor
CNRS UMR3691
Email: batiste.boeda@pasteur.fr
Phone : 01-45-68-82-12

EG-VEGF, BV8, and their receptor expression in human bronchi and their modification in cystic fibrosis: Impact of CFTR mutation (delF508)

Sylvain Chauvet,^{1,2,3} Wael Traboulsi,^{2,3,4} Laura Thevenon,^{2,3,4} Amal Kouadri,^{1,2,3} Jean-Jacques Feige,^{2,3,4} Boubou Camara,⁵ Nadia Alfaidy,^{2,3,4} and Mohamed Benharouga^{1,2,3}

¹Centre National de la Recherche Scientifique, LCBM-UMR 5249, Grenoble, France; ²Commissariat à l'Energie Atomique, DSV-IRTSV, Grenoble, France; ³Grenoble Alpes Université, Grenoble, France; ⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1036, Grenoble, France; and ⁵Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose, Clinique Universitaire de Pneumologie-Pole Thorax et Vaisseaux, CHU de Grenoble, France

Submitted 15 December 2014; accepted in final form 22 May 2015

Chauvet S, Traboulsi W, Thevenon L, Kouadri A, Feige JJ, Camara B, Alfaidy N, Benharouga M. EG-VEGF, BV8, and their receptor expression in human bronchi and their modification in cystic fibrosis: Impact of CFTR mutation (delF508). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309: L314–L322, 2015. First published June 5, 2015; doi:10.1152/ajplung.00382.2014.—Enhanced lung angiogenesis has been reported in cystic fibrosis (CF). Recently, two highly homologous ligands, endocrine gland vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) and mammalian Bv8, have been described as new angiogenic factors. Both ligands bind and activate two closely related G protein-coupled receptors, the prokineticin receptor (PROKR) 1 and 2. Yet, the expression, regulation, and potential role of EG-VEGF, BV8, and their receptors in normal and CF lung are still unknown. The expression of the receptors and their ligands was examined using molecular, biochemical, and immunocytochemistry analyses in lungs obtained from CF patients vs. control and in normal and CF bronchial epithelial cells. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity was evaluated in relation to both ligands, and concentrations of EG-VEGF were measured by ELISA. At the mRNA level, EG-VEGF, BV8, and PROKR2 gene expression was, respectively, approximately five, four, and two times higher in CF lungs compared with the controls. At the cellular level, both the ligands and their receptors showed elevated expressions in the CF condition. Similar results were observed at the protein level. The EG-VEGF secretion was apical and was approximately two times higher in CF compared with the normal epithelial cells. This secretion was increased following the inhibition of CFTR chloride channel activity. More importantly, EG-VEGF and BV8 increased the intracellular concentration of Ca²⁺ and cAMP and stimulated CFTR-chloride channel activity. Altogether, these data suggest local roles for epithelial BV8 and EG-VEGF in the CF airway peribronchial vascular remodeling and highlighted the role of CFTR activity in both ligand biosynthesis and secretion.

cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; lung angiogenesis; BV8/endocrine gland vascular endothelial growth factor; prokineticin receptors

CYSTIC FIBROSIS (CF) arises from mutations in the gene that encodes for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein (9, 32), an epithelial apical cAMP- and ATP-regulated chloride channel (38). The most frequent mutation, deletion of phenylalanine at position 508 (delF508) in the first nucleotide-binding domain, is detected in ~70% of CF chromosomes (13). The delF508-CFTR protein is mis-

folded, virtually completely blocked, and rapidly eliminated at the endoplasmic reticulum (17).

CFTR protein dysfunction results in abnormal ion transport across the airway epithelium (7), progressively leading to the production of viscous mucus that obstructs the airways, underlying the subsequent inflammatory reactions and infections. Both processes combined with progressive bronchiectasis lead to the development of airway structural abnormalities that include subepithelial fibrosis, remodeling of airway epithelium and submucosal glands, and hyperplasia of airway smooth muscles (4, 31).

Airway remodeling in CF and other obstructive airway disorders is known to result from a long-standing bronchial inflammation (35, 39). Inflammatory mediators and growth factors have the capacity to cause cell infiltration and epithelial injury and to increase bronchial vascularization. The latter is due to the activation of the angiogenic process, which contributes to increase the portal entry for inflammatory cells (40). The magnitude of the vascular remodeling is correlated to the degree of inflammation resulting from infection, since it is not observed, to such extent, in noninfective chronic inflammation (40).

Signs of excessive angiogenesis have been reported in CF patients who develop highly vascularized nasal polyps requiring surgical resection. Moreover, angiogenesis-related complications, such as pulmonary hemorrhage and hemoptysis, are frequent in CF patients (11). Altogether these findings suggest that angiogenesis processes might contribute to the pathogenicity of CF. Nevertheless, the underlying angiogenic mechanisms associated with CF development and its aggravation are still unknown.

In CF patients, the increased pulmonary microvascular density associated with a significant increase in circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) was first reported by Crawford et al. (8). The increase in the circulating VEGF levels was observed in subjects with CF and in subjects with other pulmonary inflammatory disorders. However, in CF, this increase was correlated to the level of bacterial infection and chronic airway inflammation (8).

Hence, elevations in circulating VEGF might promote pulmonary angiogenesis, which participates in the progression of the disease in the lung (27). The production of VEGF, and the induction of angiogenesis, is commonly interpreted as a consequence of the inflammation process. Importantly, Verhaeghe et al. (37) reported that local overproduction of proangiogenic factors in CF fetal human tracheal epithelial cells was sufficient to stimulate angiogenesis. Their results suggest that the intrin-

Address for reprint requests and other correspondence: M. Benharouga, LCBM-UMR5249, DSV-IRTSV, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, F-38054, Grenoble cedex 09, France (e-mail: mohamed.benharouga@cea.fr).

Table 1. Clinical characteristics of control and CF subjects

	Control (n = 10)	CF (n = 10)
Male sex, n	7	8
Female sex, n	3	2
Age, yr	60–67 (10)	42 (1), 21 (6), 31 (3)
CFTR genotype, n		
F508del/F508del	0	7
F508del/2184delA	0	2
delF508/R798	0	1
Bronchial colonization <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	10

n, No. of subjects; CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.

sic proangiogenic status of the CF respiratory epithelial cells contributes to the development of lung angiogenesis. Recently, Martin et al. (24) investigated the role of VEGF-A in the peribronchial pulmonary vascularization. They demonstrated that the airway epithelium is the main site of VEGF-A expression that was increased in CF patients and in *Cftr*-deficient mice. Also, they reported that the inhibition of CFTR activity induced a twofold increase in VEGF-A production. Altogether these data suggest that angiogenic factors might contribute the lung pathogenesis of CF.

During the last decade, two highly homologous cysteine-rich peptides, prokineticin 1 (PROK1) and prokineticin 2 (PROK2), were described as new angiogenic factors that are increased in response to stressful conditions such as hypoxia, inflammation, and abnormal vascularization (28). PROK1, also known as endocrine gland vascular endothelial growth factor (EG-VEGF), based on the functional similarities to VEGF, stimulates endocrine gland cell proliferation/migration and promotes angiogenesis in the mouse ovary, placenta, and cardiac tissue (2, 19). PROK2, or mammalian Bv8, is believed to affect behavioral circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and to promote angiogenesis in the testis and cardiac tissue (6, 18). PROKs bind and activate two closely related G protein-coupled receptors, prokineticin receptor 1 (PROKR1) and 2 (PROKR2), which are 87% identical (21, 34). PROKs stimulate Ca^{2+} mobilization in PROKR-expressing cells, presumably through a receptor/ G_q protein interaction (21, 34). Pertussis toxin inhibits EG-VEGF-induced mitogen-activated protein kinase signaling (21), suggesting that EG-VEGF may also be coupled to G_i proteins. In addition, signal transduction studies showed that these ligands induce cAMP accumulation in PROKR-expressing cells, indicating that PROKR2s are also coupled to G_s proteins (5).

These peptides and their receptors were reported to localize in the brain, dorsal root ganglia neurons, granulocytes, placenta, and testis (12, 29). Yet the expression, localization, regulation, and potential role of EG-VEGF/BV8 and their respective receptors in normal and CF lung angiogenesis are still unknown.

The present work aimed at determining the expression profiles of EG-VEGF/BV8 and their receptors in the lung tissues from CF subjects compared with control nonsmokers. Because the airway epithelium appeared as an important site of EG-VEGF/BV8 and PROKR expression in CF airways, we further studied the impact of CFTR chloride channel activity on EG-VEGF/BV8 synthesis, secretion, and function in established normal and CF airway epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Human tissues collection. Peripheral human lung tissues (containing noncartilaginous airways) were obtained at the time of lung transplantation from 10 nonsmoking CF adults and from 10 nonsmoking controls undergoing lung resection for peripheral lung cancer (Grenoble Hospital). Clinical characteristics of these patients are provided in Table 1. Lung tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin by inflation immersion and embedded in paraffin. To reduce the potential sampling bias related to irregular distribution of morphological abnormalities in CF patients, tissues were obtained from two to four blocks, whose locations were chosen randomly. In control subjects, only one block was available for the study. Collection and processing of human lungs conformed to the Declaration of Helsinki and to all rules of the local Committees on Human Research. Informed consent was obtained from each patient.

Immunohistochemistry. In this study, we also used ready 5- μ m paraffin-embedded sections prepared from human CF and non-CF peripheral lung tissues. Slides were generously obtained from Lantuejoul, (Department of Anatomopathology, Grenoble Hospital). Immunohistochemistry was performed as described previously (10). For antigen detection, sections were incubated with the following antibodies: anti-BV8, anti-EGVEGF, anti-PROKR1, and anti-PROKR2 (Covalab). Immunopositive staining was detected using a Vectastain ABC kit (Vector Labs), using DAB as the chromagen (Vector Labs). Slides were counterstained using hematoxylin and eosin (Sigma Aldrich).

Cell culture. We used the human alveolar adenocarcinoma cell line A549 and human bronchiolar epithelial cell lines 16HBE14o- expressing wild-type CFTR (HBE) and CFBE41o- (CFBE) derived from a cystic fibrosis patient, homozygous for the delF508 allele (delF508/delF508) (generous gift from Dieter Gruenert, University of California at San Francisco).

The cells were grown, respectively, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and in Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), glutamine, penicillin, and streptomycin at 37°C under 5% CO_2 and routinely grown, respectively, in normal plastic dishes or in plastic dishes coated with an extracellular matrix containing fibronectin, collagen, and bovine serum albumin.

To ensure the development of differentiated monolayers, some experiments were performed after culturing HBE and CFBE cells for 3–5 days at confluence on 12-mm Transwell polycarbonate filters (0.4- μ m pore size). Differentiation of the epithelia was verified by the accumulation of zonula occludens-1 at tight junctions and by trans-epithelial electrical resistance measurement (data not show).

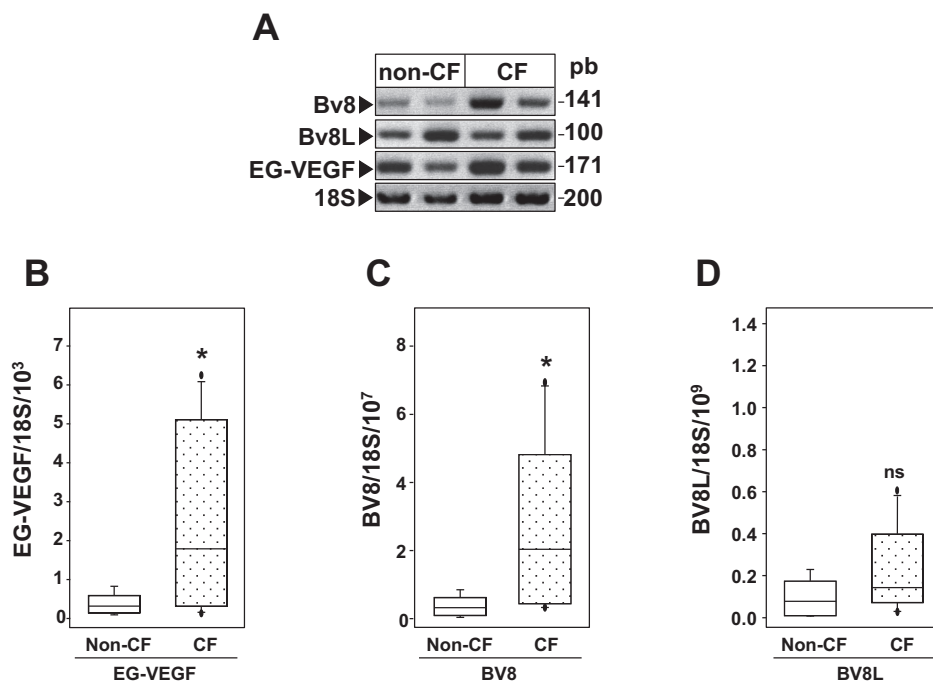
Extraction of total RNA and reverse transcription. Total RNA was extracted from lung tissues. The extraction was performed according

Table 2. Primers used for real-time PCR

ADNc	Primer Sequence 5'→3'	Size, bp
EG-VEGF	FW: AGGTCCCCTTCTTCAGGAAACG	171
	BW: TCCAGGCTGTGCTCAGGAAAAG	
Bv8	FW: TGTGACAAGGACTCCCAATGTGGTG	141
	BW: CCGCCGAAAAAATGGAACCTTACG	
Bv8L	FW: CTATGGGCAAACTGGGAGAC	1
	BW: AGACATGGGCAAGTGATG	
PROKR1	FW: CGGCATTGGAAACTTCATCT	338
	BW: GTGGCAGGTAGTTGACAGA	
PROKR2	FW: CACCATGACCCTGTGCTATG	198
	BW: ACAGTGGGGAAGAAGTCACG	
18S	FW: AAACGGCTACCACATCCAAG	155
	BW: CCTCCAATGGATCCTCGTTA	

EG-VEGF, endocrine gland vascular endothelial growth factor; PROKR, prokineticin receptor; FW, forward, BW, backward (reverse primer).

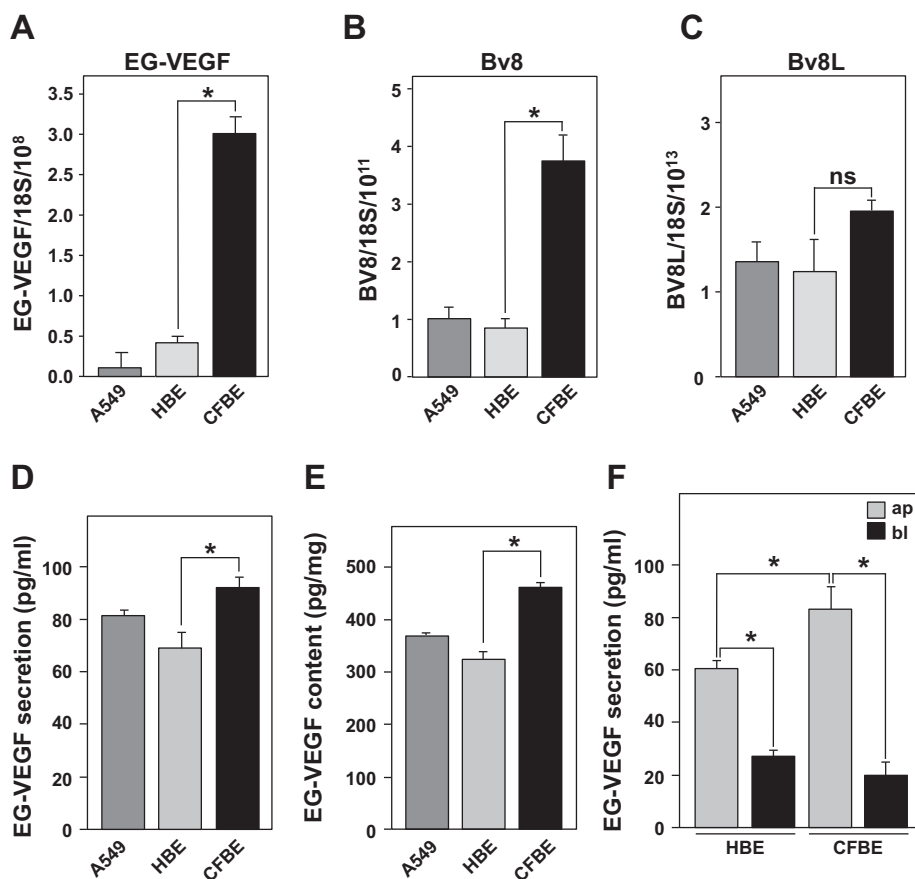
Fig. 1. Expression of BV8, BV8L, and endocrine gland vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) in human lung. **A**: RT-PCR detection of the ligand mRNA in normal and cystic fibrosis (CF) human airway epithelium. **B–D**: expression levels of EG-VEGF (**B**), BV8 (**C**), and BV8L (**D**) mRNAs were quantified by real-time RT-PCR and normalized to the 18S rRNA levels. Biopsies from nonsmoking normal (non-CF) and CF subjects were used. Data are expressed as means \pm SE ($n = 3$ subjects). *Significantly different from the control ($P < 0.05$). NS, nonsignificant.



to the manufacturer's protocol (RNAagents; Promega). Total RNA (1 μ g) was used in reverse transcription using Superscript II-RNaseH reverse transcriptase under conditions recommended by the manufacturer (Invitrogen).

Quantitative polymerase chain reaction. BV8, BV8L, EG-VEGF, PROKR1, and PROKR2 mRNAs and 18S rRNA expressions were quantified by real-time PCR using a Light Cycler apparatus (Bio-Rad). The PCR was performed using the primers shown in Table 2

Fig. 2. BV8, BV8L, and EG-VEGF expression in human alveolar and bronchial epithelial cells. **A–C**: RNAs from alveolar (A549) and bronchial [human bronchiolar epithelial cell lines 16HBE14o-expressing wild-type cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (HBE) and CFBE41o-(CFBE)] cells were extracted, and transcript expression levels of BV8, BV8L, and EG-VEGF were analyzed by real-time RT-PCR. Data are normalized by quantification of the 18S rRNA transcripts and are representative of at least 3 distinct experiments. **D–F**: quantification by ELISA of EG-VEGF production in supernatants (**D**), in protein extracts of A549, HBE, and CFBE cells (**E**), and in supernatants collected from apical and basolateral side of HBE and CFBE cells cultured on semipermeable filter (**F**). Data are expressed in pg/ml of conditioned media (**E**) and in pg/mg of protein extract. Data are expressed as means \pm SE ($n = 3$). *Significantly different from the control ($P < 0.05$).



and SYBR green PCR core reagents according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad). The PCR condition and cycle were as follows: initial DNA denaturation 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, follow by an annealing step, and then extension at 60°C during 1 min. Each point was performed in triplicate. To ensure that the primers produced a single and specific PCR amplification product, a dissociation curve was performed during the PCR cycle, and only primers with a unique dissociation peak were selected, followed by migration on a 2% agarose gel to ensure that the PCR product was unique. The PCR products were then sequenced to confirm that the correct cDNA was amplified. The expression level of each gene was adjusted by the level of 18S mRNA and expressed as the ratio to 18S mRNA. The CFX Manager software was used to quantify levels of expression (Bio-Rad).

Electrophoresis and immunoblotting. Protein extracts, prepared as previously described (10), were subjected to an SDS-PAGE (12%) and immunoblot analysis using rabbit polyclonal anti-PROKR1 and -PROKR2 (Covalab), and monoclonal anti- β -actin (Hybridoma Bank, University of Iowa). Images were captured using the Molecular Imaging acquisition system (Vilber Lourmat).

Intracellular Ca^{2+} mobilization assays. To evaluate intracellular Ca^{2+} mobilization following BV8 or EGVEGF stimulations, HBE and CFBE cells were seeded in poly-D-lysine-coated 96-well black wall tissue culture plates (BD Biosciences).

Ligand-stimulated Ca^{2+} mobilization was assayed using fluo 3 Ca^{2+} dye (Invitrogen) at a final concentration of 4 μ M in dye loading buffer [DMEM F-12 medium without phenol red (Invitrogen) containing 2.5 mM probenecid] at room temperature for 1 h. Cells were then washed one time with dye loading buffer, and calcium mobilization in response to BV8 and EG-VEGF was assayed in a fluorometric imaging plate reader (Infinite M200; TECAN) as described previously (22).

Measurements of cAMP levels. For the measurement of cAMP mobilization, HBE and CFBE cells were plated into 12-well plates (1.5×10^6 cells/well). After 2 days of culture, cells were pretreated for 30 min with 0.5 mM 3-isobutyl,1-methylxanthine in serum-free medium before the addition of EG-VEGF or BV8 for 24 h. Intracellular cAMP concentrations were measured using the cAMP enzyme immunoassay system (GE Healthcare, Indianapolis, IN) as recommended by the manufacturer.

Measurement of the cAMP-stimulated CFTR activity. The plasma membrane cAMP-dependent halide conductance of HBE and CFBE cells was determined using iodide efflux as previously described (33). Iodide efflux was initiated by replacing the loading buffer with efflux medium (composed of 136 mM nitrate instead of iodide). The extracellular medium was replaced every minute with efflux buffer (1 ml). After the steady state was reached, the intracellular cAMP level was raised by agonists (10 μ M forskolin, 0.2 mM CTP-cAMP, and 0.2 mM isobutyl methylxanthane) to achieve maximal phosphorylation of the CFTR protein. The collection of the efflux medium resumed for an additional 6–9 min. The amount of iodide in each sample was determined with an iodide-selective electrode (Orion).

EG-VEGF quantification by ELISA. EG-VEGF secretion was measured by ELISA (PeproTech) in the cell culture-conditioned media. Two separated standard curves were constructed to allow accurate readings of samples at upper and lower ranges of the assay. All samples were in the linear range of the standard curves. The detection limit of the assay was 16 pg/ml. Data were expressed as pictograms per milligram of protein extracted from HBE and CFBE.

Data analysis. Data are presented as mean values \pm SE. Statistical comparisons were made using unpaired data Student's *t*-test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

CF tissues and CF cells differentially express and secrete BV8 and EG-VEGF. Previous gene expression profile analysis reported an upregulation of numerous proangiogenic genes in CF cells, namely basic fibroblast growth factor, fibroblast growth factor 5, placental growth factor, platelet-derived growth factor-C, platelet-derived growth factor-a polypeptide, angiopoietin 1, VEGF-A, and VEGF-C (37). However, the expression profiles of the new angiogenic factors, BV8 and EG-VEGF, has not yet been investigated. In CF lung tissue explants, both BV8 and EG-VEGF mRNA levels were upregulated compared with the control tissue (Fig. 1, A–C).

An alternatively spliced product of the BV8 gene encoding 21 additional amino acids compared with BV8, and designated as BV8L (for BV8 long form), has been shown to be broadly expressed. Compared with BV8, BV8L mRNA expression was shown to be lower in the brain, undetectable in the kidney, and higher in the lung and the spleen (5).

In CF, the mRNA level of BV8L did not show any significant changes compared with the control (Fig. 1, A and C), suggesting that BV8L has a limited role in CF.

At the cellular level, similar results were observed. The levels of EG-VEGF and BV8 mRNA were, respectively, approximately

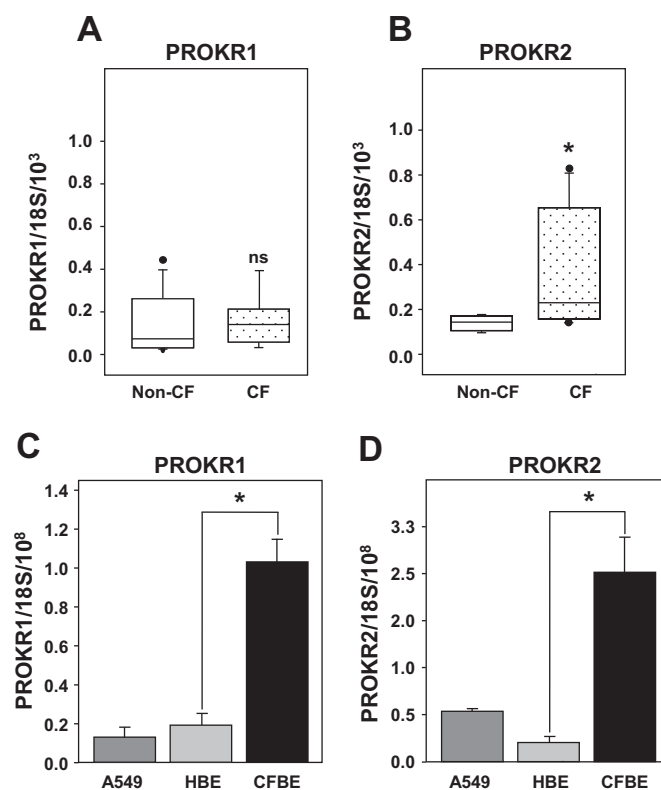
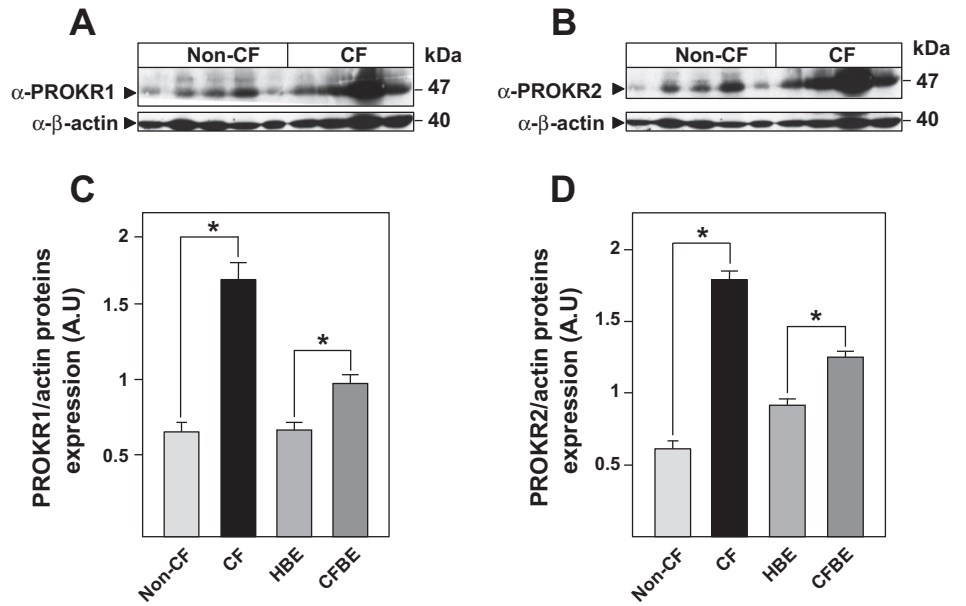


Fig. 3. Expression of prokineticin receptor (PROKR) 1 and 2 mRNA in normal and CF human lung. *A* and *B*: expression levels of PROKR1 (*A*) and PROKR2 (*B*) mRNAs were quantified by real-time RT-PCR and normalized to the 18S rRNA levels. Biopsies from non-CF and CF subjects were used. Data are expressed as means \pm SE ($n = 3$). *Significantly different from the control ($P < 0.05$). *C* and *D*: RNAs from alveolar (A549) and bronchial (HBE and CFBE) cells were extracted, and transcript expression levels of PROKR1 (*C*) and PROKR2 (*D*) were analyzed by real-time RT-PCR. Data are normalized by quantification of the 18S rRNA transcripts and are representative of at least 3 distinct experiments.

Fig. 4. Protein expression of PROKR1 and PROKR2 in normal and CF human lung. *A* and *B*: expression of PROKR1 (*A*) and PROKR2 (*B*) proteins in non-CF and CF human lung tissues and in HBE and CFBE cell lines was monitored with immunoblotting using polyclonal anti-PROKR1 and anti-PROKR2 antibodies, and the enhanced chemiluminescence detection system (ECL). Black arrowheads indicate the corresponding proteins (47 kDa). The blot is representative of 3 independent experiments. Expression of β -actin was monitored with monoclonal anti- β -actin antibodies. *C* and *D*: Image J quantification of the expression levels of the PROKR1 (*C*) and PROKR2 (*D*) protein standardized to β -actin expression. Data are expressed as means \pm SE ($n = 3$). *Significantly different from the corresponding control ($P < 0.05$).



six and four times higher in CF cells (CFBE) compared with HBE cells (Fig. 2, *A* and *B*). Similar to the data obtained with the tissue analysis, no significant difference in BV8L mRNA levels could be observed between HBE and CFBE cells (Fig. 2*C*). There was no difference in the BV8L expression in bronchial and alveolar cells (Fig. 2*C*). The increase in EG-VEGF levels in CFBE cells was further investigated by comparing its secretion and content in A549, HBE, and CFBE cells using ELISA test. Figure 2, *D* and *E*, shows that both EG-VEGF secretion and content are significantly

increased in CF cells. These data substantiate the findings at the mRNA levels and demonstrate that EG-VEGF secretion is also increased in CF cells. These results also suggest that CFTR protein might prompt EG-VEGF secretion. To get more insight into the site of EG-VEGF secretion by the polarized HBE and CFBE epithelial cells, apical and basolateral media were collected, and EG-VEGF were evaluated. The results indicated in Fig. 2*F* show that in both cells type EG-VEGF secretion was mainly apical.

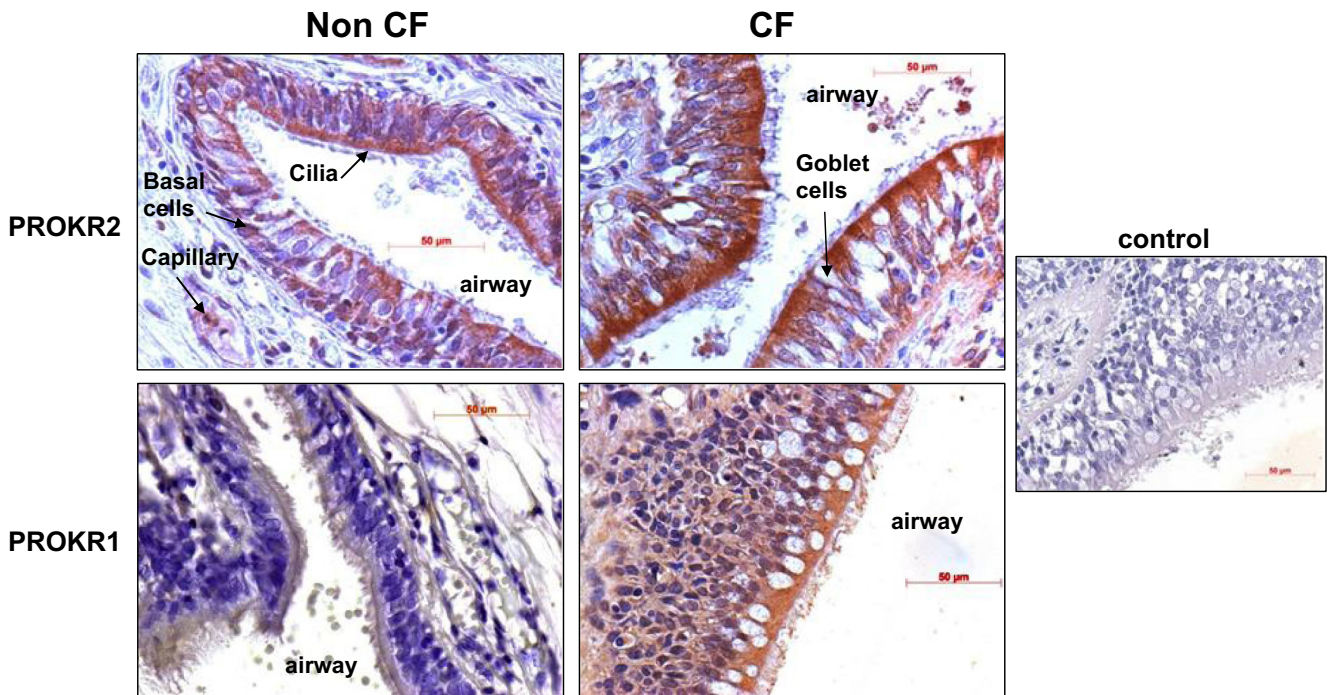


Fig. 5. Representative photomicrographs of PROKR1 and PROKR2 immunostaining in human airways. Airway sections were obtained in human control patients (non-CF) vs. CF patients. Sections were stained with an antibody to PROKR1 or PROKR2 (brown color) and counterstained with hematoxylin and eosin. Photomicrographs were representative of results obtained in 6 controls and in 6 CF patients. Omission of primary antibodies or incubation with rabbit or mouse serum eliminated staining in control sections (undersized photographs). Scale bars 50 μ m.

PROKR1 and PROKR2 are highly expressed in CF. BV8 and EG-VEGF share two cognate GPCRs receptors (PROKR1 and PROKR2) that share 80–90% identity (21, 34). We compared the levels of expression of the two receptors in CF and non-CF conditions. Using quantitative RT-PCR, only PROKR2 was highly expressed in CF tissues compared with normal specimens (Fig. 3, A and B).

However, both receptors were highly expressed in CF cells (CFBE) compared with normal ones (HBE) (Fig. 3, C and D). No differences in the level of expression of PROKR1 and PROKR2 were observed when comparing bronchial with alveolar cells (Fig. 3, C and D).

At the protein level, with the use of Western blotting analysis, both receptors were upregulated in CF lung tissues and were retrieved at a band around 47 kDa (Fig. 3, A and B), as already described (29). Quantification of independent experiments indicated that PROKR1 and PROKR2 are highly expressed, not only in CF tissues, but also in CFBE cells (Fig. 4, C and D).

PROKR1 and PROKR2 are expressed on the cell surface of respiratory epithelial cells. To get more insights into the cellular expression of PROKR1 and PROKR2 in the human lungs and compare their localizations in CF and non-CF lung tissues, we performed immunohistochemistry. Figure 5 shows that normal lung tissues express more PROKR2 than PROKR1. The intensities of expression for both receptors increased in the CF tissue sections. More importantly, in the CF condition, both receptors appear more concentrated at the apical membrane of the basal cells and within the goblet cells. Strong staining could also be observed for PROKR2 in the endothelial cells within the capillaries (Fig. 5). These findings

suggest that PROKR1 and PROKR2 might play important roles in the respiratory functions both under physiological and pathological conditions.

BV8 and EG-VEGF stimulate Ca^{2+} mobilization and cAMP production and activate chloride ion secretion. BV8 and EG-VEGF have been reported to stimulate Ca^{2+} mobilization in PROKR-expressing cells (21, 34). We compared BV8 and EG-VEGF stimulation of Ca^{2+} mobilization in HBE and CFBE cells. Our results showed that both ligands significantly stimulate Ca^{2+} mobilization in HBE and CFBE cells (Fig. 6A). There was no difference in the levels of mobilized Ca^{2+} upon EG-VEGF and BV8 treatment in HBE and CFBE cells.

Because PROKR1 and PROKR2 activations were reported to stimulate cAMP accumulation, we examined their effects on cAMP accumulation in HBE and CFBE cells. In the absence of these ligands, only a basal cAMP production was detected. BV8 or EG-VEGF at 50 ng/ml significantly increased cAMP production in HBE. This increase was more important in the CFBE cells (Fig. 6B).

Consistent with the notion that cAMP accumulation accounts, at least in part, for the CFTR chloride channel activity, we evaluated the cAMP-activated anion conductance of the plasma membrane (Fig. 6C). As expected, CFBE cells did not show any iodine compared with HBE cells that endogenously express the wild-type CFTR (Fig. 6C). The treatment of HBE cells with BV8 or EG-VEGF showed a significant increase in the CFTR activity (Fig. 6D). These data suggest that EG-VEGF/BV8 through the activation of their receptors might play an important role in the physiological processes of normal and CF human lung function.

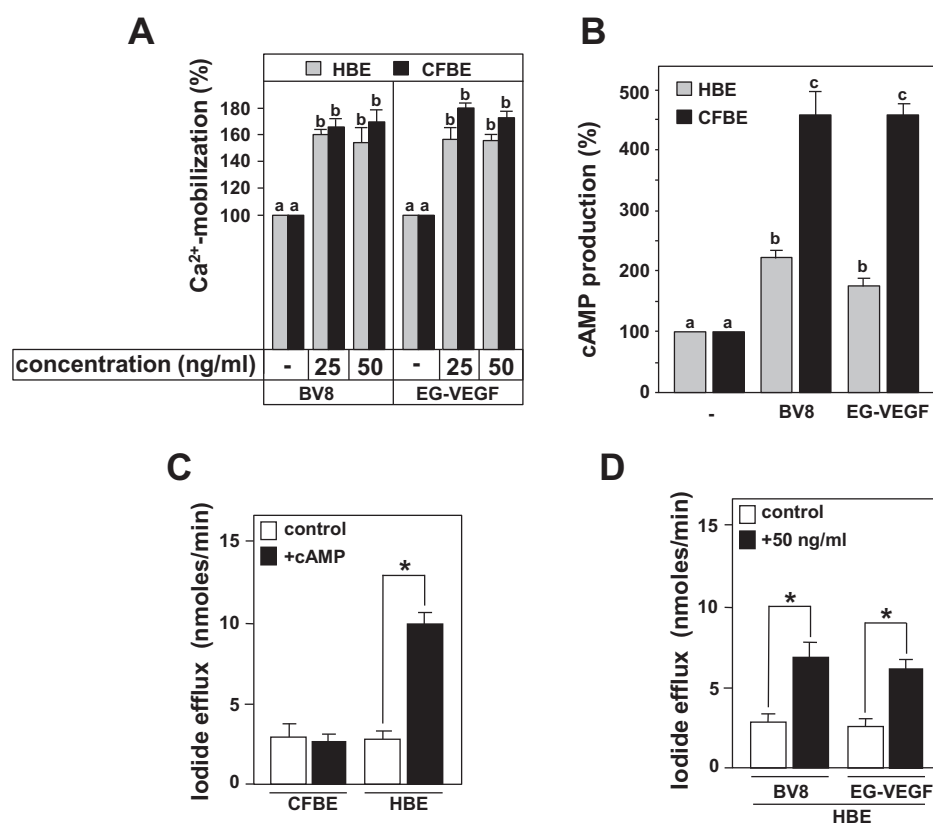


Fig. 6. A: evaluation of intracellular Ca^{2+} mobilization following BV8 and EG-VEGF stimulation in HBE and CFBE cells. Intracellular Ca^{2+} was measured as indicated in MATERIALS AND METHODS. B: stimulation of cAMP accumulation in HBE and CFBE cells following stimulation either with 50 ng BV8 or EG-VEGF. The accumulated cAMP was measured as indicated in MATERIALS AND METHODS. Data are expressed as means \pm SE ($n = 3$). Values overwritten with different letters (*a*, *b*, *c*) are significantly different from each other ($P < 0.05$). C and D: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity was monitored using cAMP-stimulated iodide release from CFBE and HBE cells. The iodide efflux was measured after 1 and 2 min of cAMP-dependent protein kinase stimulation (C) or after 5 min stimulation by 50 ng of BV8 or EG-VEGF (D). Iodide release from CFBE and HBE cells is expressed as nmol/min (mean \pm SE, $n = 4$, * $P < 0.05$).

Role of CFTR-mediated chloride secretion on BV8/EG-VEGF transcription and secretion. We showed in Fig. 2 that BV8 and EG-VEGF expression and EG-VEGF secretion were higher in CF cells (CFBE) compared with normal cells (HBE). Data in Fig. 6 reporting the iodide-efflux results (Fig. 6D) confirmed the presence of a cAMP-activated chloride channel. Nevertheless, the relationship between CFTR activity and BV8/EG-VEGF transcription and secretion had still to be established. Using CFTR-inh172 (10 μ M), a selective inhibitor of CFTR chloride channel activity (23), we observed an \sim 1.5-fold increase in EG-VEGF secretion in HBE cells (Fig. 7A).

To examine whether the effect of CFTR inhibition on EG-VEGF secretion was related to a transcriptional effect, we evaluated EG-VEGF, BV8, PROKR1, and PROKR2 mRNA expression using QPCR. Treatment of HBE cells with CFTR-inh172 (10 μ M) induced a significant increase in EG-VEGF mRNA levels after 6 h of treatment (Fig. 7B).

The CFTR inhibition also increased BV8 and PROKR2 mRNA expression. We did not observe any significant effect on the mRNA expression levels of BV8L and PROKR1 (Fig. 7, C–F).

DISCUSSION

CF is the most common life-threatening inherited disease in the Caucasian population. Abnormal airway surface liquid results in recurrent lower respiratory tract infections, inflammation, and airway remodeling (4, 31). To our knowledge, this

is the first report concerning the expression, localization, and potential role of two new angiogenic factors, BV8 and EG-VEGF, and their receptors, PROKR1 and PROKR2, in normal and CF human lungs.

Our results show that the airway epithelium is an important site for BV8, EG-VEGF, PROKR1, and PROKR2 expression. This expression was increased in CF patients compared with control subjects. In the airway epithelial cell line carrying a homozygote CF mutation (delF508), both ligands and their receptors were highly expressed compared with the wild-type cells. In these cells, the absence or the inhibition of CFTR chloride secretion resulted in increased BV8 and EG-VEGF biosynthesis and secretion. The present study also suggests that PROKR1 and PROKR2 are functionally coupled to the CFTR protein through the mobilization of intracellular cAMP.

BV8, EG-VEGF, PROKR1, and PROKR2 were localized to ciliated cells and in their precursors, i.e., the basal cells. The immunolabeling of both receptors showed that PROKR1 and PROKR2 were localized to the apical plasma membrane, where CFTR normally resides. Similar localization was also reported for the β_2 -adrenergic receptor (36). EG-VEGF was secreted at the apical site of CFBE and HBE cells, suggesting a potential role of prokineticins at the airway site.

The immunostaining study also revealed a cytoplasm localization for these receptors that probably corresponds to their constitutively internalization process.

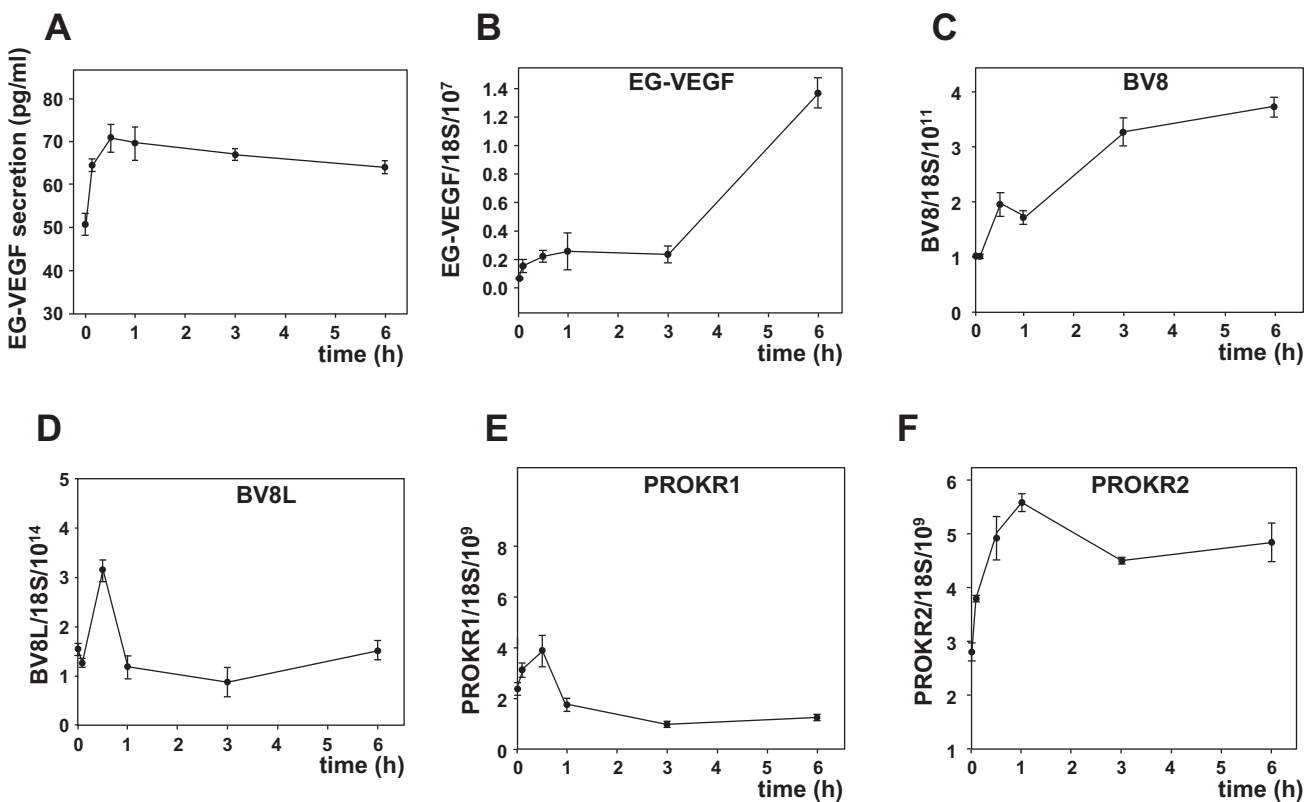


Fig. 7. Time-dependent effect of CFTR inhibition on the expression of prokineticin factors and their receptors and on EG-VEGF secretion. A: effect of selective CFTR inhibitors on EG-VEGF secretion in HBE cells. Secretion of EG-VEGF was evaluated in conditioned media using ELISA following HBE cell treatment with 10 μ M of CFTR-inh172 for the indicated times. B–F: effect of selective CFTR inhibitors on EG-VEGF (B), BV8 (C), BV8L (D), PROKR1 (E), and PROKR2 (F) expression in HBE cells. Cells were cultured in the absence or presence of 10 μ M of CFTR-inh172. mRNA expression was measured using quantitative PCR, and the results are standardized to the housekeeping gene 18S. All results were expressed as means \pm SE of 3 independent experiments.

In the epithelial cell model, both receptors were functional, and their stimulation by the corresponding ligands mobilized intracellular calcium and cAMP, as previously reported (21, 26).

Our results show that human bronchial epithelial cells carrying the homozygous CFTR mutation delF508 display a higher proangiogenic status compared with control epithelial cells. This proangiogenic status is characterized by an increased production of BV8, EG-VEGF, and PROKR2. For PROKR1 receptor, however, only its protein expression was upregulated in CF tissues and cells. These results suggest that both receptors are not regulated in the same way in normal and CF conditions. Our results suggest that BV8 and EG-VEGF should be considered as new angiogenic lung factors that might contribute to the increased angiogenesis observed in the CF disease.

Furthermore, these findings reveal that CF epithelial cells have the potential to efficiently induce angiogenesis through the release of multiple angiogenic factors, and raise the possibility that they could also initiate or increase the inflammation-related vascular remodeling in CF patients.

Our conclusion that CFTR dysfunction might trigger BV8 and EGVEGF synthesis is based on data obtained in cultured airway epithelial cells. Indeed, use of CF epithelial cells lacking apical chloride ion secretion or the inhibition of the CFTR activity in non-CF epithelial cells showed an increase in BV8/EG-VEGF biosynthesis and secretion.

Similar results were reported for the most potent angiogenic factor, VEGF-A. Verhaeghe et al. (37), using a human fetal cell line carrying the homozygous mutation delF508, and Martin et al. (24), by inhibiting the function of CFTR protein in a normal airway epithelial cell line, reported increased VEGF-A synthesis compared with control human cells. Our data provided circumstantial evidence of a role for CFTR dysfunction in BV8/EG-VEGF production. Finally, the absence of CFTR activity induced both increased BV8/EG-VEGF mRNA and protein synthesis, suggesting a transcriptional effect. Further studies are required to determine whether the effect is related to mRNA synthesis and/or mRNA stabilization.

The increase of BV8/EG-VEGF synthesis in CFBE cells was independent of infection and inflammation. However, increased BV8/EG-VEGF expression observed in CF airway epithelium at transplantation could be related to multiple factors, such as proinflammatory cytokines, microbial products from bacteria (116, 25), and to a hypoxic environment (15).

It is well established that hypoxic environment might accompany CF disease in the lung as a result of the CF-associated oxidative stress (1, 3). Hypoxia is also known to upregulate BV8 and EG-VEGF (19, 20), suggesting that the increased levels of both ligands observed in CF might be a consequence of this phenomenon.

Because BV8 and EG-VEGF can regulate a wide variety of biological processes, including angiogenesis, and inflammatory responses (20, 30), their elevated expression in CF may reflect the severity and neutrophil predominance of inflammation in this disorder (14).

Higher BV8 and EG-VEGF levels in CF may also be related to airway infection and that both ligands may be used as sensitive surrogate markers of airway inflammation associated with airway infection. Further studies including subjects with CF, chronic bronchitis, and bronchiectasis would further clar-

ify the relationship between infection, inflammation, and BV8/EG-VEGF.

Our study highlights the ability of CF epithelial cells to intrinsically promote angiogenesis via the expression of angiogenic factors, including the EG-VEGF/Bv8 family. This suggests that therapies directly targeting a reduction in BV8/EG-VEGF synthesis and/or action to antagonized PROKR2 receptors could represent a promising method of reducing vascular remodeling in CF airways. Because angiogenesis is correlated with more severe pulmonary diseases, therapies based on the use of antiangiogenic factors could also be considered to reduce this phenomenon and to decrease the severity of the CF pathology.

GRANTS

This work was supported by the French Cystic Fibrosis Foundation [Vaincre la Mucoviscidose (VLM)] and ABCF Association for Cystic Fibrosis. S. Chauvet was supported by a Ph.D. Fellowship from VLM. We acknowledge the following sources of funding: Centre National de la Recherche Scientifique (LCBM-UMR 5249); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1036), Commissariat à l'Energie Atomique/DSV/iRTSV, and Grenoble Alpes University.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: S.C., W.T., L.T., A.K., and M.B. performed experiments; S.C., W.T., L.T., and M.B. analyzed data; S.C. and M.B. prepared figures; S.C., W.T., L.T., J.-J.F., B.C., N.A., and M.B. approved final version of manuscript; J.-J.F., B.C., N.A., and M.B. edited and revised manuscript; N.A. and M.B. interpreted results of experiments; N.A. and M.B. drafted manuscript; M.B. conception and design of research.

REFERENCES

- Bradley S, Solin P, Wilson J, Johns D, Walters EH, Naughton MT. Hypoxemia and hypercapnia during exercise and sleep in patients with cystic fibrosis. *Chest* 116: 647–654, 1999.
- Brouillet S, Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. EG-VEGF: a key endocrine factor in placental development. *Trends Endocrinol Metab* 23: 501–508, 2012.
- Buchdahl RM, Babiker A, Bush A, Cramer D. Predicting hypoxaemia during flights in children with cystic fibrosis. *Thorax* 56: 877–879, 2001.
- Burgel PR, Montani D, Danel C, Dusser DJ, Nadel JA. A morphometric study of mucins and small airway plugging in cystic fibrosis. *Thorax* 62: 153–161, 2007.
- Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F, Mazur C, Lovenberg T, Liu C. Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol* 67: 2070–2076, 2005.
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417: 405–410, 2002.
- Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med* 18: 509–519, 2012.
- Crawford S, Stellmach V, McColley S, Jacobitz J, Backer C. Elevated inducer of angiogenesis and increased microvascular density suggest a role for neovascularization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol Suppl* 1997, p. 296.
- Cutting GR, Kasch LM, Rosenstein BJ, Zielenski J, Tsui LC, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr. A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. *Nature* 346: 366–369, 1990.
- Donadio S, Alfaidy N, De Keukeleire B, Micoud J, Feige JJ, Challis JR, Benharouga M. Expression and localization of cellular prion and COMMD1 proteins in human placenta throughout pregnancy. *Placenta* 28: 907–911, 2007.

11. Flume PA, Yankaskas JR, Ebeling M, Hulsey T, Clark LL. Massive hemoptysis in cystic fibrosis. *Chest* 128: 729–738, 2005.
12. Hoffmann P, Saudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N. Role of EG-VEGF in human placenta: physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med* 13: 2224–2235, 2009.
13. Kerem E, Corey M, Kerem B, Durie P, Tsui LC, Levison H. Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis, with or without meconium ileus. *J Pediatr* 114: 767–773, 1989.
14. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1075–1082, 1995.
15. Kim SR, Lee KS, Park HS, Park SJ, Min KH, Moon H, Puri KD, Lee YC. HIF-1 α inhibition ameliorates an allergic airway disease via VEGF suppression in bronchial epithelium. *Eur J Immunol* 40: 2858–2869, 2010.
16. Koff JL, Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L1068–L1075, 2008.
17. Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* 79: S167–S173, 1999.
18. LeCouter J, Ferrara N. EG-VEGF and Bv8, a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Trends Cardiovasc Med* 13: 276–282, 2003.
19. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412: 877–884, 2001.
20. LeCouter J, Lin R, Tejada M, Frantz G, Peale F, Hillan KJ, Ferrara N. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2685–2690, 2003.
21. Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 277: 19276–19280, 2002.
22. Liu C, Wilson SJ, Kuei C, Lovenberg TW. Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H₄ receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 121–130, 2001.
23. Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galletta LJ, Verkman AS. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest* 110: 1651–1658, 2002.
24. Martin C, Coolen N, Wu Y, Thevenot G, Touqui L, Pruliere-Escabasse V, Papon JF, Coste A, Escudier E, Dusser DJ, Fajac I, Burgel PR. CFTR dysfunction induces vascular endothelial growth factor synthesis in airway epithelium. *Eur Respir J* 42: 1553–1562, 2013.
25. Martin C, Thevenot G, Danel S, Chapron J, Tazi A, Macey J, Dusser DJ, Fajac I, Burgel PR. *Pseudomonas aeruginosa* induces vascular endothelial growth factor synthesis in airway epithelium in vitro and in vivo. *Eur Respir J* 38: 939–946, 2011.
26. Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, Fujino M. Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 396–402, 2002.
27. McColley SA, Stellmach V, Boas SR, Jain M, Crawford SE. Serum vascular endothelial growth factor is elevated in cystic fibrosis and decreases with treatment of acute pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1877–1880, 2000.
28. Monnier J, Samson M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett* 296: 144–149, 2010.
29. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Canestrelli M, Nicotra A, Melchiorri P. Bv8/prokineticins and their receptors a new pronociceptive system. *Int Rev Neurobiol* 85: 145–157, 2009.
30. Ngan ES, Tam PK. Prokineticin-signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1679–1684, 2008.
31. Regamey N, Jeffery PK, Alton EW, Bush A, Davies JC. Airway remodelling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax* 66: 624–629, 2011.
32. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenki J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066–1073, 1989.
33. Sharma M, Benharouga M, Hu W, Lukacs GL. Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. *J Biol Chem* 276: 8942–8950, 2001.
34. Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushima H, Furuichi K. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1579: 173–179, 2002.
35. Sund M, Hamano Y, Sugimoto H, Sudhakar A, Soubasakos M, Yerramalla U, Benjamin LE, Lawler J, Kieran M, Shah A, Kalluri R. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2934–2939, 2005.
36. Taouil K, Hinrasky J, Hologne C, Corlieu P, Klossek JM, Puchelle E. Stimulation of beta 2-adrenergic receptor increases cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in human airway epithelial cells through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Biol Chem* 278: 17320–17327, 2003.
37. Verhaeghe C, Tabruyn SP, Oury C, Bours V, Griffioen AW. Intrinsic pro-angiogenic status of cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 745–749, 2007.
38. Welsh MJ, Anderson MP, Rich DP, Berger HA, Denning GM, Ost-edgaard LS, Sheppard DN, Cheng SH, Gregory RJ, Smith AE. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: a chloride channel with novel regulation. *Neuron* 8: 821–829, 1992.
39. Wilson JW, Bamford TL. Assessing the evidence for remodelling of the airway in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 14: 229–247, 2001.
40. Wilson JW, Robertson CF. Angiogenesis in paediatric airway disease. *Paediatr Respir Rev* 3: 219–229, 2002.

Bibliographie

- [1] Brigid L.M. Hogan, Christina E. Barkauskas, Harold A. Chapman et al. „Repair and Regeneration of the Respiratory System : Complexity, Plasticity, and Mechanisms of Lung Stem Cell Function“. In : *Cell Stem Cell* 15.2 (août 2014), p. 123–138 (cf. p. 3).
- [2] Frederic H Martini. *Human anatomy plus mastering a & p*. OCLC : 960079931. Pearson, 2014 (cf. p. 4).
- [3] „Dictionary - Normal : Bronchus - The Human Protein Atlas“. In : () (cf. p. 5, 8).
- [4] „Alveoli, Organs and structures of the respiratory system, By OpenStax (Page 5/63)“. In : *QuizOver.com* () (cf. p. 6).
- [5] A. Bai, D. H. Eidelman, J. C. Hogg et al. „Proposed nomenclature for quantifying subdivisions of the bronchial wall“. In : *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 77.2 (août 1994), p. 1011–1014 (cf. p. 7).
- [6] E. M. McDowell, L. A. Barrett, F. Glavin, C. C. Harris et B. F. Trump. „The respiratory epithelium. I. Human bronchus“. In : *Journal of the National Cancer Institute* 61.2 (août 1978), p. 539–549 (cf. p. 7).
- [7] B. Jain, I. Rubinstein, R. A. Robbins et J. H. Sisson. „TNF-alpha and IL-1 beta upregulate nitric oxide-dependent ciliary motility in bovine airway epithelium“. In : *The American Journal of Physiology* 268.6 (juin 1995), p. L911–917 (cf. p. 9).
- [8] A. R. Khan, B. Bengtsson et S. Lindberg. „Influence of substance P on ciliary beat frequency in airway isolated preparations“. In : *European Journal of Pharmacology* 130.1 (14 oct. 1986), p. 91–96 (cf. p. 9).
- [9] D. J. Mussatto, C. S. Garrard et R. V. Lourenco. „The effect of inhaled histamine on human tracheal mucus velocity and bronchial mucociliary clearance“. In : *The American Review of Respiratory Disease* 138.4 (oct. 1988), p. 775–779 (cf. p. 9).
- [10] M. J. Sanderson et E. R. Dirksen. „Mechanosensitive and beta-adrenergic control of the ciliary beat frequency of mammalian respiratory tract cells in culture“. In : *The American Review of Respiratory Disease* 139.2 (fév. 1989), p. 432–440 (cf. p. 9).
- [11] R. T. Ellison et T. J. Giehl. „Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme“. In : *The Journal of Clinical Investigation* 88.4 (oct. 1991), p. 1080–1091 (cf. p. 9).

- [12]J. E. Heffner et J. E. Repine. „Pulmonary strategies of antioxidant defense“. In : *The American Review of Respiratory Disease* 140.2 (août 1989), p. 531–554 (cf. p. 9).
- [13]A. W. Stadnyk. „Cytokine production by epithelial cells“. In : *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8.13 (oct. 1994), p. 1041–1047 (cf. p. 9).
- [14]W. R. Roche, S. Montefort, J. Baker et S. T. Holgate. „Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium“. In : *The American Review of Respiratory Disease* 148.6 (déc. 1993), p. 579–82 (cf. p. 9).
- [15]Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis et al. „Cell Junctions“. In : (2002) (cf. p. 9, 10, 12, 14).
- [16]Andrea Hartsock et W. James Nelson. „Adherens and tight junctions : Structure, function and connections to the actin cytoskeleton“. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778.3 (mar. 2008), p. 660–669 (cf. p. 10, 14, 15).
- [17]Dwan Price, Leigh Ackland et Cenk Suphioglu. „Nuts ’n’ guts : transport of food allergens across the intestinal epithelium“. In : *Asia Pacific Allergy* 3.4 (oct. 2013), p. 257–265 (cf. p. 10).
- [18]G Feldman, J Mullin et M Ryan. „Occludin : Structure, function and regulation“. In : *Advanced Drug Delivery Reviews* 57.6 (25 avr. 2005), p. 883–917 (cf. p. 11).
- [19]Dorothee Günzel et Michael Fromm. „Claudins and Other Tight Junction Proteins“. In : *Comprehensive Physiology*. Sous la dir. de Ronald Terjung. DOI : 10.1002/cphy.c110045. Hoboken, NJ, USA : John Wiley & Sons, Inc., juil. 2012 (cf. p. 11).
- [20]Gerd Krause, Lars Winkler, Sebastian L. Mueller et al. „Structure and function of claudins“. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778.3 (mar. 2008), p. 631–645 (cf. p. 11).
- [21]Ylermi Soini. „Claudins in lung diseases“. In : *Respiratory Research* 12.1 (2011), p. 70 (cf. p. 11).
- [22]Gianfranco Bazzoni. „The JAM family of junctional adhesion molecules“. In : *Current Opinion in Cell Biology* 15.5 (oct. 2003), p. 525–530 (cf. p. 11).
- [23]A. S. Fanning, B. J. Jameson, L. A. Jesaitis et J. M. Anderson. „The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 273.45 (6 nov. 1998), p. 29745–29753 (cf. p. 11).
- [24]L. González-Mariscal, A. Betanzos et A. Avila-Flores. „MAGUK proteins : structure and role in the tight junction“. In : *Seminars in Cell & Developmental Biology* 11.4 (août 2000), p. 315–324 (cf. p. 11).
- [25]O. Huber. „Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease“. In : *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60.9 (1^{er} sept. 2003), p. 1872–1890 (cf. p. 13).

- [26]D. B. Ivanov, M. P. Philippova et V. A. Tkachuk. „Structure and functions of classical cadherins“. In : *Biochemistry. Biokhimiia* 66.10 (oct. 2001), p. 1174–1186 (cf. p. 13).
- [27]L. Shapiro et W. I. Weis. „Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins“. In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1.3 (1^{er} sept. 2009), a003053–a003053 (cf. p. 13, 15).
- [28]Andrew P. Kowalczyk et Kathleen J. Green. „Structure, Function, and Regulation of Desmosomes“. In : *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. T. 116. DOI : 10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4. Elsevier, 2013, p. 95–118 (cf. p. 13).
- [29]J. Zhurinsky, M. Shtutman et A. Ben-Ze'ev. „Plakoglobin and beta-catenin : protein interactions, regulation and biological roles“. In : *Journal of Cell Science* 113 (Pt 18) (sept. 2000), p. 3127–3139 (cf. p. 13).
- [30]Masayuki Shimizu, Yoshitaka Fukunaga, Junichi Ikenouchi et Akira Nagafuchi. „Defining the roles of beta-catenin and plakoglobin in LEF/T-cell factor-dependent transcription using beta-catenin/plakoglobin-null F9 cells“. In : *Molecular and Cellular Biology* 28.2 (jan. 2008), p. 825–835 (cf. p. 13).
- [31]W. Meng et M. Takeichi. „Adherens Junction : Molecular Architecture and Regulation“. In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1.6 (1^{er} déc. 2009), a002899–a002899 (cf. p. 14).
- [32]Elaine Fuchs et Srikala Raghavan. „Getting under the skin of epidermal morphogenesis“. In : *Nature Reviews Genetics* 3.3 (mar. 2002), p. 199 (cf. p. 14).
- [33]Frauke Drees, Sabine Pokutta, Soichiro Yamada, W. James Nelson et William I. Weis. „Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly“. In : *Cell* 123.5 (2 déc. 2005), p. 903–915 (cf. p. 15).
- [34]Sabine Pokutta, Frauke Drees, Soichiro Yamada, W. James Nelson et William I. Weis. „Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts“. In : *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 2 avr. 2008), p. 141–147 (cf. p. 15).
- [35]Soichiro Yamada, Sabine Pokutta, Frauke Drees, William I. Weis et W. James Nelson. „Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex“. In : *Cell* 123.5 (2 déc. 2005), p. 889–901 (cf. p. 15).
- [36]P. Z. Anastasiadis et A. B. Reynolds. „The p120 catenin family : complex roles in adhesion, signaling and cancer“. In : *Journal of Cell Science* 113 (Pt 8) (avr. 2000), p. 1319–1334 (cf. p. 15).
- [37]Yasuyuki Fujita, Gerd Krause, Martin Scheffner et al. „Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex“. In : *Nature Cell Biology* 4.3 (mar. 2002), p. 222–231 (cf. p. 15).

- [38]Christine M. Chiasson, Kristin B. Wittich, Peter A. Vincent, Victor Faundez et Andrew P. Kowalczyk. „p120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a Rho-independent mechanism“. In : *Molecular Biology of the Cell* 20.7 (avr. 2009), p. 1970–1980 (cf. p. 15).
- [39]J. R. Riordan, J. M. Rommens, B. Kerem et al. „Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA“. In : *Science (New York, N.Y.)* 245.4922 (8 sept. 1989), p. 1066–1073 (cf. p. 17, 18).
- [40]ANDERSEN DH. „Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease : A clinical and pathologic study“. In : *American Journal of Diseases of Children* 56.2 (1^{er} août 1938), p. 344–399 (cf. p. 17).
- [41]Sidney Farber. „Pancreatic Insufficiency and the Celiac Syndrome“. In : *New England Journal of Medicine* 229.18 (28 oct. 1943), p. 682–687 (cf. p. 17).
- [42]P. A. Di Sant’agnese, R. C. Darling, G. A. Perera et E. Shea. „Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas ; clinical significance and relationship to the disease“. In : *Pediatrics* 12.5 (nov. 1953), p. 549–563 (cf. p. 17).
- [43]L. E. Gibson et R. E. Cooke. „A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis“. In : *Pediatrics* 23.3 (mar. 1959), p. 545–549 (cf. p. 17).
- [44]S. C. Hyde, P. Emsley, M. J. Hartshorn et al. „Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport“. In : *Nature* 346.6282 (26 juil. 1990), p. 362–365 (cf. p. 19).
- [45]C. F. Higgins. „ABC transporters : from microorganisms to man“. In : *Annual Review of Cell Biology* 8 (1992), p. 67–113 (cf. p. 19).
- [46]J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick et N. J. Gay. „Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold“. In : *The EMBO journal* 1.8 (1982), p. 945–951 (cf. p. 19).
- [47]Esther Biemans-Oldehinkel, Mark K. Doeven et Bert Poolman. „ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains“. In : *FEBS letters* 580.4 (13 fév. 2006), p. 1023–1035 (cf. p. 19).
- [48]S. Devidas et W. B. Guggino. „CFTR : domains, structure, and function“. In : *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29.5 (oct. 1997), p. 443–451 (cf. p. 19, 20).
- [49]M. H. Akabas, M. Cheung et R. Guinamard. „Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel“. In : *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29.5 (oct. 1997), p. 453–463 (cf. p. 19).

- [50]Mark F. Rosenberg, Alhaji Bukar Kamis, Luba A. Aleksandrov, Robert C. Ford et John R. Riordan. „Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 279.37 (10 sept. 2004), p. 39051–39057 (cf. p. 19).
- [51]Soo Jung Kim et William R. Skach. „Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum“. In : *Frontiers in Pharmacology* 3 (2012), p. 201 (cf. p. 20).
- [52]Fangyu Liu, Zhe Zhang, László Csanády, David C. Gadsby et Jue Chen. „Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel“. In : *Cell* 169.1 (23 mar. 2017), 85–95.e8 (cf. p. 20).
- [53]M. P. Anderson, H. A. Berger, D. P. Rich et al. „Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel“. In : *Cell* 67.4 (15 nov. 1991), p. 775–784 (cf. p. 20).
- [54]M. P. Anderson, R. J. Gregory, S. Thompson et al. „Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity“. In : *Science (New York, N.Y.)* 253.5016 (12 juil. 1991), p. 202–205 (cf. p. 20).
- [55]D. C. Dawson, S. S. Smith et M. K. Mansoura. „CFTR : mechanism of anion conduction“. In : *Physiological Reviews* 79.1 (jan. 1999), S47–75 (cf. p. 20).
- [56]Paul Linsdell. „Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel“. In : *Experimental Physiology* 91.1 (jan. 2006), p. 123–129 (cf. p. 20, 106).
- [57]D. N. Sheppard et M. J. Welsh. „Structure and function of the CFTR chloride channel“. In : *Physiological Reviews* 79.1 (jan. 1999), S23–45 (cf. p. 20).
- [58]Ilana Kogan, Mohabir Ramjeesingh, Canhui Li et al. „CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux“. In : *The EMBO journal* 22.9 (1^{er} mai 2003), p. 1981–1989 (cf. p. 20).
- [59]B. Letz et C. Korbmacher. „cAMP stimulates CFTR-like Cl⁻ channels and inhibits amiloride-sensitive Na⁺ channels in mouse CCD cells“. In : *The American Journal of Physiology* 272.2 (fév. 1997), p. C657–666 (cf. p. 20).
- [60]A. Ruknudin, D. H. Schulze, S. K. Sullivan, W. J. Lederer et P. A. Welling. „Novel subunit composition of a renal epithelial KATP channel“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 273.23 (5 juin 1998), p. 14165–14171 (cf. p. 20).
- [61]E. M. Schwiebert, D. J. Benos, M. E. Egan, M. J. Stutts et W. B. Guggino. „CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel“. In : *Physiological Reviews* 79.1 (jan. 1999), S145–166 (cf. p. 20).
- [62]R. Schreiber, H. Pavenstädt, R. Greger et K. Kunzelmann. „Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“. In : *FEBS letters* 475.3 (23 juin 2000), p. 291–295 (cf. p. 20).
- [63]Pamela L. Zeitlin. „Cystic fibrosis and estrogens : a perfect storm“. In : *The Journal of Clinical Investigation* 118.12 (1^{er} déc. 2008), p. 3841–3844 (cf. p. 21).

- [64]Eitan Kerem. „Mutation specific therapy in CF“. In : *Paediatric Respiratory Reviews* 7 Suppl 1 (2006), S166–169 (cf. p. 21, 22, 106, 107).
- [65]Emilie Vallières et Joseph Stuart Elborn. „Cystic fibrosis gene mutations : evaluation and assessment of disease severity“. In : *Advances in Genomics and Genetics* (21 oct. 2014). DOI : 10.2147/AGG.S53768 (cf. p. 22).
- [66]Caroline Norez, Fabrice Antigny, Frédéric Becq et Clarisse Vandebrouck. „Maintaining low Ca²⁺ level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells“. In : *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7.5 (mai 2006), p. 562–573 (cf. p. 22).
- [67]Katherine B. Hisert, Sonya L. Heltshe, Christopher Pope et al. „Restoring Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Reduces Airway Bacteria and Inflammation in People with Cystic Fibrosis and Chronic Lung Infections“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 195.12 (15 juin 2017), p. 1617–1628 (cf. p. 23, 107).
- [68]Ashley L. Cooney, Mahmoud H. Abou Alaiwa, Viral S. Shah et al. „Lentiviral-mediated phenotypic correction of cystic fibrosis pigs“. In : *JCI insight* 1.14 (8 sept. 2016) (cf. p. 23).
- [69]Ilia Villate-Beitia, Jon Zarate, Gustavo Puras et José Luis Pedraz. „Gene delivery to the lungs : pulmonary gene therapy for cystic fibrosis“. In : *Drug Development and Industrial Pharmacy* 43.7 (juil. 2017), p. 1071–1081 (cf. p. 23).
- [70]Marcus Mall et Karl Kunzelmann. „Correction of the CF defect by curcumin : hopes and disappointments“. In : *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 27.1 (jan. 2005), p. 9–13 (cf. p. 23, 135).
- [71]Béla Z. Schmidt, Jérémy B. Haaf, Teresinha Leal et Sabrina Noel. „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis : current perspectives“. In : *Clinical Pharmacology : Advances and Applications* 8 (2016), p. 127–140 (cf. p. 24).
- [72]„Medical gallery of Blausen Medical 2014“. In : *WikiJournal of Medicine* 1.2 (2014) (cf. p. 25).
- [73]Nancy D. Kim et Andrew D. Luster. „The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment“. In : *Trends in Immunology* 36.9 (sept. 2015), p. 547–555 (cf. p. 27).
- [74]J. Palmblad. „The role of granulocytes in inflammation“. In : *Scandinavian Journal of Rheumatology* 13.2 (1984), p. 163–172 (cf. p. 27).
- [75]M. B. Hampton, A. J. Kettle et C. C. Winterbourn. „Inside the neutrophil phagosome : oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing“. In : *Blood* 92.9 (1^{er} nov. 1998), p. 3007–3017 (cf. p. 27).
- [76]Volker Brinkmann, Ulrike Reichard, Christian Goosmann et al. „Neutrophil extracellular traps kill bacteria“. In : *Science (New York, N.Y.)* 303.5663 (5 mar. 2004), p. 1532–1535 (cf. p. 27).

- [77]Volker Brinkmann et Arturo Zychlinsky. „Beneficial suicide : why neutrophils die to make NETs“. In : *Nature Reviews. Microbiology* 5.8 (août 2007), p. 577–582 (cf. p. 27).
- [78]Jr Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport et Mark J. Shlomchik. „The components of the immune system“. In : (2001) (cf. p. 28).
- [79]H. Suzuki, S. Miura, Y. Y. Liu, M. Tsuchiya et H. Ishii. „Substance P induces degranulation of mast cells and leukocyte adhesion to venular endothelium“. In : *Peptides* 16.8 (1995), p. 1447–1452 (cf. p. 28).
- [80]A. Dragonetti, M. Baldassarre, R. Castino et al. „The lysosomal protease cathepsin D is efficiently sorted to and secreted from regulated secretory compartments in the rat basophilic/mast cell line RBL“. In : *Journal of Cell Science* 113 (Pt 18) (sept. 2000), p. 3289–3298 (cf. p. 28).
- [81]Catherine Cho, Anna Nguyen, Katherine J. Bryant, Sean G. O’Neill et H. Patrick McNeil. „Prostaglandin D₂ metabolites as a biomarker of *in vivo* mast cell activation in systemic mastocytosis and rheumatoid arthritis : Prostaglandin D₂ as a biomarker of mast cell activation“. In : *Immunity, Inflammation and Disease* 4.1 (mar. 2016), p. 64–69 (cf. p. 28).
- [82]Adriano Francisco Alves, Giciane Carvalho Vieira, Francisco Allysso A. F. Gadelha et al. „Milonine, an Alkaloid of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) Inhibits Histamine Release of Activated Mast Cells“. In : *Inflammation* 40.6 (déc. 2017), p. 2118–2128 (cf. p. 28).
- [83]P. Bradding, I. H. Feather, S. Wilson et al. „Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation“. In : *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151.7 (1^{er} oct. 1993), p. 3853–3865 (cf. p. 28).
- [84]Kathryn E. Barletta, R. Elaine Cagnina, Kori L. Wallace et al. „Leukocyte compartments in the mouse lung : distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury“. In : *Journal of Immunological Methods* 375.1 (31 jan. 2012), p. 100–110 (cf. p. 28).
- [85]Theoharis C. Theoharides, Konstantinos-Dionysios Alysandratos, Asimena Angelidou et al. „Mast cells and inflammation“. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822.1 (jan. 2012), p. 21–33 (cf. p. 28).
- [86]Björn Petri et M. Gabriele Bixel. „Molecular events during leukocyte diapedesis“. In : *FEBS Journal* 273.19 (oct. 2006), p. 4399–4407 (cf. p. 28).
- [87]Elzbieta Kolaczowska et Paul Kubes. „Neutrophil recruitment and function in health and inflammation“. In : *Nature Reviews Immunology* 13.3 (25 fév. 2013), p. 159–175 (cf. p. 28).
- [88]Anne M. Manicone. „Role of the pulmonary epithelium and inflammatory signals in acute lung injury“. In : *Expert Review of Clinical Immunology* 5.1 (1^{er} jan. 2009), p. 63–75 (cf. p. 29).

- [89]R. M. Strieter. „What Differentiates Normal Lung Repair and Fibrosis ? : Inflammation, Resolution of Repair, and Fibrosis“. In : *Proceedings of the American Thoracic Society* 5.3 (15 avr. 2008), p. 305–310 (cf. p. 29).
- [90]D. Metcalf. „Hematopoietic cytokines“. In : *Blood* 111.2 (15 jan. 2008), p. 485–491 (cf. p. 30).
- [91]Elizabeth M. Gardner et Donna M. Murasko. „Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans“. In : *Biogerontology* 3.5 (2002), p. 271–290 (cf. p. 30).
- [92]D. R. Lucey, M. Clerici et G. M. Shearer. „Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases“. In : *Clinical Microbiology Reviews* 9.4 (oct. 1996), p. 532–562 (cf. p. 30).
- [93]S Gaffen et K Liu. „Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications“. In : *Cytokine* 28.3 (7 nov. 2004), p. 109–123 (cf. p. 30).
- [94]Jason C. Steel, Thomas A. Waldmann et John C. Morris. „Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer“. In : *Trends in Pharmacological Sciences* 33.1 (jan. 2012), p. 35–41 (cf. p. 30).
- [95]Sidney Pestka, Christopher D. Krause et Mark R. Walter. „Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors“. In : *Immunological Reviews* 202.1 (déc. 2004), p. 8–32 (cf. p. 30).
- [96]Mario P. Colombo et Giorgio Trinchieri. „Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy“. In : *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13.2 (avr. 2002), p. 155–168 (cf. p. 30).
- [97]I. G. Luzina, A. D. Keegan, N. M. Heller et al. „Regulation of inflammation by interleukin-4 : a review of "alternatives"“. In : *Journal of Leukocyte Biology* 92.4 (1^{er} oct. 2012), p. 753–764 (cf. p. 30, 31).
- [98]William E. Paul. „History of interleukin-4“. In : *Cytokine* 75.1 (sept. 2015), p. 3–7 (cf. p. 30).
- [99]Guillermo Arango Duque et Albert Descoteaux. „Macrophage Cytokines : Involvement in Immunity and Infectious Diseases“. In : *Frontiers in Immunology* 5 (7 oct. 2014) (cf. p. 31).
- [100]Kevin W. Moore, Rene de Waal Malefyt, Robert L. Coffman et Anne O’Garra. „I INTERLEUKIN -10 AND THE I INTERLEUKIN -10 R ECEPTOR“. In : *Annual Review of Immunology* 19.1 (avr. 2001), p. 683–765 (cf. p. 31).
- [101]H. U. Zeilhofer et W. Schorr. „Role of interleukin-8 in neutrophil signaling“. In : *Current Opinion in Hematology* 7.3 (mai 2000), p. 178–182 (cf. p. 31).

- [102] Satish L. Deshmane, Sergey Kremlev, Shohreh Amini et Bassel E. Sawaya. „Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) : An Overview“. In : *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29.6 (juin 2009), p. 313–326 (cf. p. 31).
- [103] Srinivasan Srirangan et Ernest H. Choy. „The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis“. In : *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 2.5 (oct. 2010), p. 247–256 (cf. p. 31).
- [104] Cem Gabay. „Interleukin-6 and chronic inflammation“. In : *Arthritis Research & Therapy* 8 Suppl 2 (2006), S3 (cf. p. 31).
- [105] Mark D. Turner, Belinda Nedjai, Tara Hurst et Daniel J. Pennington. „Cytokines and chemokines : At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease“. In : *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843.11 (nov. 2014), p. 2563–2582 (cf. p. 32).
- [106] G. M. Nixon, D. S. Armstrong, R. Carzino et al. „Early airway infection, inflammation, and lung function in cystic fibrosis“. In : *Archives of Disease in Childhood* 87.4 (oct. 2002), p. 306–311 (cf. p. 32).
- [107] T. Z. Khan, J. S. Wagener, T. Bost et al. „Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 151.4 (avr. 1995), p. 1075–1082 (cf. p. 32, 67).
- [108] K. Balough, M. McCubbin, M. Weinberger et al. „The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis“. In : *Pediatric Pulmonology* 20.2 (août 1995), p. 63–70 (cf. p. 32).
- [109] Grace Y. Chen et Gabriel Nuñez. „Sterile inflammation : sensing and reacting to damage“. In : *Nat Rev Immunol* 10.12 (déc. 2010), p. 826–837 (cf. p. 32).
- [110] Naveen Pillarisetti, Elizabeth Williamson, Barry Linnane et al. „Infection, inflammation, and lung function decline in infants with cystic fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184.1 (1^{er} juil. 2011), p. 75–81 (cf. p. 32).
- [111] D. S. Armstrong, K. Grimwood, R. Carzino et al. „Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis“. In : *BMJ (Clinical research ed.)* 310.6994 (17 juin 1995), p. 1571–1572 (cf. p. 32–34).
- [112] D. G. Downey, S. C. Bell et J. S. Elborn. „Neutrophils in cystic fibrosis“. In : *Thorax* 64.1 (jan. 2009), p. 81–88 (cf. p. 32).
- [113] Sarah R. Walmsley, Cristin Print, Neda Farahi et al. „Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity“. In : *The Journal of Experimental Medicine* 201.1 (3 jan. 2005), p. 105–115 (cf. p. 33).
- [114] Hang Pong Ng, Yun Zhou, Kejing Song et al. „Neutrophil-Mediated Phagocytic Host Defense Defect in Myeloid Cfr-Inactivated Mice“. In : *PLoS ONE* 9.9 (3 sept. 2014). Sous la dir. de Charaf Benarafa, e106813 (cf. p. 33).

- [115]K. Pohl, E. Hayes, J. Keenan et al. „A neutrophil intrinsic impairment affecting Rab27a and degranulation in cystic fibrosis is corrected by CFTR potentiator therapy“. In : *Blood* 124.7 (14 août 2014), p. 999–1009 (cf. p. 33).
- [116]I. Graff, A. Schram-Doumont et C. Szpirer. „Defective protein kinase C-mediated actions in cystic fibrosis neutrophils“. In : *Cellular Signalling* 3.3 (1991), p. 259–266 (cf. p. 33).
- [117]D. Y. Koller, R. Urbanek et M. Götz. „Increased degranulation of eosinophil and neutrophil granulocytes in cystic fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152.2 (août 1995), p. 629–633 (cf. p. 33).
- [118]Amit Gaggar, Yao Li, Nathaniel Weathington et al. „Matrix metalloprotease-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients“. In : *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 293.1 (juil. 2007), p. L96–L104 (cf. p. 33).
- [119]Simon Brockbank, Damian Downey, J. Stuart Elborn et Madeleine Ennis. „Effect of cystic fibrosis exacerbations on neutrophil function“. In : *International Immunopharmacology* 5.3 (mar. 2005), p. 601–608 (cf. p. 33).
- [120]F. Ratjen, C.-M. Hartog, K. Paul, J. Wermelt et J. Braun. „Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha“. In : *Thorax* 57.11 (nov. 2002), p. 930–934 (cf. p. 33).
- [121]Scott D. Sagel, Robert K. Kapsner et Iris Osberg. „Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis“. In : *Pediatric Pulmonology* 39.3 (mar. 2005), p. 224–232 (cf. p. 33).
- [122]A. P. Watt, J. Courtney, J. Moore, M. Ennis et J. S. Elborn. „Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis“. In : *Thorax* 60.8 (août 2005), p. 659–664 (cf. p. 33).
- [123]R. William Vandivier, Valerie A. Fadok, Carol Anne Ogden et al. „Impaired clearance of apoptotic cells from cystic fibrosis airways“. In : *Chest* 121.3 (mar. 2002), 89S (cf. p. 33).
- [124]Theo J. Moraes, Jonathan Plumb, Raiza Martin et al. „Abnormalities in the pulmonary innate immune system in cystic fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 34.3 (mar. 2006), p. 364–374 (cf. p. 33).
- [125]Harriet Corvol, Catherine Fitting, Katarina Chadelat et al. „Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis“. In : *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 284.6 (juin 2003), p. L997–1003 (cf. p. 33).
- [126]C. Hubeau, E. Puchelle et D. Gaillard. „Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis“. In : *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108.4 (oct. 2001), p. 524–529 (cf. p. 33).

- [127]R. William Vandivier, Valerie A. Fadok, Peter R. Hoffmann et al. „Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis“. In : *The Journal of Clinical Investigation* 109.5 (mar. 2002), p. 661–670 (cf. p. 33).
- [128]Mario Ollero, Omer Junaidi, Munir M. Zaman et al. „Decreased expression of peroxisome proliferator activated receptor? in CFTR?/? mice“. In : *Journal of Cellular Physiology* 200.2 (août 2004), p. 235–244 (cf. p. 33).
- [129]Raffaella Soleti, Chiara Porro et Maria Carmen Martínez. „Apoptotic process in cystic fibrosis cells“. In : *Apoptosis* 18.9 (sept. 2013), p. 1029–1038 (cf. p. 33).
- [130]T. L. Bonfield, M. W. Konstan, P. Burfeind et al. „Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 13.3 (sept. 1995), p. 257–261 (cf. p. 33, 35).
- [131]Benjamin T. Kopp, Basant A. Abdulrahman, Arwa A. Khweek et al. „Exaggerated inflammatory responses mediated by Burkholderia cenocepacia in human macrophages derived from Cystic fibrosis patients“. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424.2 (juil. 2012), p. 221–227 (cf. p. 33).
- [132]P.-X. Zhang, T. S. Murray, V. R. Vilella et al. „Reduced Caveolin-1 Promotes Hyperinflammation due to Abnormal Heme Oxygenase-1 Localization in Lipopolysaccharide-Challenged Macrophages with Dysfunctional Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“. In : *The Journal of Immunology* 190.10 (15 mai 2013), p. 5196–5206 (cf. p. 33).
- [133]T. L. Bonfield, C. A. Hodges, C. U. Cotton et M. L. Drumm. „Absence of the cystic fibrosis transmembrane regulator (Cftr) from myeloid-derived cells slows resolution of inflammation and infection“. In : *Journal of Leukocyte Biology* 92.5 (1^{er} nov. 2012), p. 1111–1122 (cf. p. 33).
- [134]R. A. Knight, S. Kollnberger, B. Madden, M. Yacoub et M. E. Hodson. „Defective antigen presentation by lavage cells from terminal patients with cystic fibrosis“. In : *Clinical and Experimental Immunology* 107.3 (mar. 1997), p. 542–547 (cf. p. 33).
- [135]Anke Di, Mary E. Brown, Ludmila V. Deriy et al. „CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity“. In : *Nature Cell Biology* 8.9 (sept. 2006), p. 933–944 (cf. p. 33).
- [136]M. Bajmoczy, M. Gadjeva, S. L. Alper, G. B. Pier et D. E. Golan. „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and caveolin-1 regulate epithelial cell internalization of *Pseudomonas aeruginosa*“. In : *AJP : Cell Physiology* 297.2 (1^{er} août 2009), p. C263–C277 (cf. p. 33).

- [137]Pauline B. Van de Weert–van Leeuwen, Marit A. Van Meegen, Jennifer J. Speirs et al. „Optimal Complement-Mediated Phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by Monocytes Is Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator–Dependent“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49.3 (sept. 2013), p. 463–470 (cf. p. 33).
- [138]Timothy D. Starner, Carrie K. Barker, Hong Peng Jia, Yubin Kang et Paul B. McCray. „CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 29.5 (nov. 2003), p. 627–633 (cf. p. 33).
- [139]Terry E. Machen. „Innate immune response in CF airway epithelia : hyperinflammatory?“ In : *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 291.2 (août 2006), p. C218–230 (cf. p. 34).
- [140]Amanda Muir, Grace Soong, Sach Sokol et al. „Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 30.6 (juin 2004), p. 777–783 (cf. p. 34).
- [141]Patryk Moskwa, Daniel Lorentzen, Katherine J. D. A. Excoffon et al. „A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175.2 (15 jan. 2007), p. 174–183 (cf. p. 34, 35).
- [142]Zhe Zhang, Jean-Pierre Louboutin, Daniel J. Weiner, Joanna B. Goldberg et James M. Wilson. „Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5“. In : *Infection and Immunity* 73.11 (nov. 2005), p. 7151–7160 (cf. p. 34).
- [143]David Nichols, James Chmiel et Melvin Berger. „Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung : alterations in inter- and intracellular signaling“. In : *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 34.2 (avr. 2008), p. 146–162 (cf. p. 34).
- [144]R. Bals, D. J. Weiner, R. L. Meegalla, F. Accurso et J. M. Wilson. „Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25.1 (juil. 2001), p. 21–25 (cf. p. 34).
- [145]André M. Cantin, Dominik Hartl, Michael W. Konstan et James F. Chmiel. „Inflammation in cystic fibrosis lung disease : Pathogenesis and therapy“. In : *Journal of Cystic Fibrosis : Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 14.4 (juil. 2015), p. 419–430 (cf. p. 34).
- [146]M. Rosenfeld, R. L. Gibson, S. McNamara et al. „Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis“. In : *Pediatric Pulmonology* 32.5 (nov. 2001), p. 356–366 (cf. p. 34).
- [147]Marianne S. Muhlebach et Terry L. Noah. „Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165.7 (1^{er} avr. 2002), p. 911–915 (cf. p. 34).

- [148]D. S. Armstrong, K. Grimwood, J. B. Carlin et al. „Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156.4 (oct. 1997), p. 1197–1204 (cf. p. 35).
- [149]Mathilde Rottner, Jean-Marie Freyssinet et M. Carmen Martínez. „Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis“. In : *Respiratory Research* 10 (13 mar. 2009), p. 23 (cf. p. 35, 67).
- [150]S. Rao et J. Grigg. „New insights into pulmonary inflammation in cystic fibrosis“. In : *Archives of Disease in Childhood* 91.9 (sept. 2006), p. 786–788 (cf. p. 35).
- [151]L. Gao, K. J. Kim, J. R. Yankaskas et H. J. Forman. „Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia“. In : *The American Journal of Physiology* 277.1 (juil. 1999), p. L113–118 (cf. p. 35, 41).
- [152]L. W. Velsor, A. van Heeckeren et B. J. Day. „Antioxidant imbalance in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice“. In : *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 281.1 (juil. 2001), p. L31–38 (cf. p. 35, 38).
- [153]Yan Xu, Cong Liu, Jean C. Clark et Jeffrey A. Whitsett. „Functional genomic responses to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and CFTR(delta508) in the lung“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 281.16 (21 avr. 2006), p. 11279–11291 (cf. p. 35).
- [154]Anthony J. Kettle, Timothy Chan, Iris Osberg et al. „Myeloperoxidase and protein oxidation in the airways of young children with cystic fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170.12 (15 déc. 2004), p. 1317–1323 (cf. p. 35).
- [155]Anna Atlante, Maria Favia, Antonella Bobba et al. „Characterization of mitochondrial function in cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function“. In : *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 48.3 (juin 2016), p. 197–210 (cf. p. 35, 42).
- [156]Wen-Juan Huang, Xia Zhang et Wei-Wei Chen. „Role of oxidative stress in Alzheimer’s disease“. In : *Biomedical Reports* 4.5 (mai 2016), p. 519–522 (cf. p. 36).
- [157]Venus Sosa, Teresa Moliné, Rosa Somoza et al. „Oxidative stress and cancer : An overview“. In : *Ageing Research Reviews* 12.1 (jan. 2013), p. 376–390 (cf. p. 36).
- [158]Imad A.-J. Thanoon, Hilmy As Abdul-Jabbar et Dhia A. Taha. „Oxidative Stress and C-Reactive Protein in Patients with Cerebrovascular Accident (Ischaemic Stroke) : The role of Ginkgo biloba extract“. In : *Sultan Qaboos University Medical Journal* 12.2 (mai 2012), p. 197–205 (cf. p. 36).
- [159]Tanja Weinbrenner, Mercedes Cladellas, Maria Isabel Covas et al. „High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease“. In : *Atherosclerosis* 168.1 (mai 2003), p. 99–106 (cf. p. 36).

- [160] Rachel I. M. van Haften, Guido R. M. M. Haenen, Chris T. A. Evelo et Aalt Bast. „Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes“. In : *Drug Metabolism Reviews* 35.2 (août 2003), p. 215–253 (cf. p. 37).
- [161] Krzysztof Barbusinski. „Fenton reaction - Controversy concerning the chemistry“. In : *Ecological Chemistry and Engineering S* 16 (1^{er} jan. 2009), p. 347–358 (cf. p. 38).
- [162] Marcelo Genestra. „Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants“. In : *Cellular Signalling* 19.9 (sept. 2007), p. 1807–1819 (cf. p. 38, 43).
- [163] Jixiang Zhang, Xiaoli Wang, Vikash Vikash et al. „ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling“. In : *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016 (2016), p. 1–18 (cf. p. 38).
- [164] Esra Birben, Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum et Omer Kalayci. „Oxidative Stress and Antioxidant Defense :“ in : *World Allergy Organization Journal* 5.1 (jan. 2012), p. 9–19 (cf. p. 39).
- [165] Kaushik Das et Aryadeep Roychoudhury. „Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants“. In : *Frontiers in Environmental Science* 2 (2014) (cf. p. 39).
- [166] R. K. Brown, A. McBurney, J. Lunec et F. J. Kelly. „Oxidative damage to DNA in patients with cystic fibrosis“. In : *Free Radical Biology & Medicine* 18.4 (avr. 1995), p. 801–806 (cf. p. 39, 40).
- [167] Michael Schieber et Navdeep S. Chandel. „ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress“. In : *Current Biology* 24.10 (mai 2014), R453–R462 (cf. p. 39).
- [168] Ram Dixit et Richard Cyr. „Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy : effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy“. In : *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 36.2 (oct. 2003), p. 280–290 (cf. p. 39).
- [169] M. Said Ahmed, W. Y. Hung, J. S. Zu, P. Hockberger et T. Siddique. „Increased reactive oxygen species in familial amyotrophic lateral sclerosis with mutations in SOD1“. In : *Journal of the Neurological Sciences* 176.2 (15 juin 2000), p. 88–94 (cf. p. 40).
- [170] Toni R. Bartling et Mitchell L. Drumm. „Oxidative stress causes IL8 promoter hyperacetylation in cystic fibrosis airway cell models“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 40.1 (jan. 2009), p. 58–65 (cf. p. 40).
- [171] Lindsey E. Padgett, Katarzyna A. Broniowska, Polly A. Hansen, John A. Corbett et Hubert M. Tse. „The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis : Cytokines, autoimmunity, and death pathways in T1D“. In : *Annals of the New York Academy of Sciences* 1281.1 (avr. 2013), p. 16–35 (cf. p. 40).

- [172]Vuokko L. Kinnula, Cheryl L. Fattman, Roderick J. Tan et Tim D. Oury. „Oxidative stress in pulmonary fibrosis : a possible role for redox modulatory therapy“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172.4 (15 août 2005), p. 417–422 (cf. p. 40).
- [173]Di Paola Rosanna et Cuzzocrea Salvatore. „Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases“. In : *Current Pharmaceutical Design* 18.26 (2012), p. 3889–3900 (cf. p. 40).
- [174]Manish Mittal, Mohammad Rizwan Siddiqui, Khiem Tran, Sekhar P. Reddy et Asrar B. Malik. „Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury“. In : *Antioxidants & Redox Signaling* 20.7 (1^{er} mar. 2014), p. 1126–1167 (cf. p. 40).
- [175]Teru Kamogashira, Chisato Fujimoto et Tatsuya Yamasoba. „Reactive Oxygen Species, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Hearing Loss“. In : *BioMed Research International* 2015 (2015), p. 1–7 (cf. p. 40).
- [176]Antonela Lezo, Fiorella Biasi, Paola Massarenti et al. „Oxidative stress in stable cystic fibrosis patients : Do we need higher antioxidant plasma levels?“ In : *Journal of Cystic Fibrosis* 12.1 (jan. 2013), p. 35–41 (cf. p. 40, 47, 48).
- [177]J. Hull, P. Vervaart, K. Grimwood et P. Phelan. „Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis“. In : *Thorax* 52.6 (1^{er} juin 1997), p. 557–560 (cf. p. 40).
- [178]Marie-Laure Kleme et Emile Levy. „Cystic Fibrosis-Related Oxidative Stress and Intestinal Lipid Disorders“. In : *Antioxidants & Redox Signaling* 22.7 (mar. 2015), p. 614–631 (cf. p. 40).
- [179]B. L. Shapiro, R. J. Feigal et L. F. Lam. „Mitochondrial NADH dehydrogenase in cystic fibrosis“. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76.6 (juin 1979), p. 2979–2983 (cf. p. 40, 42).
- [180]R. J. Feigal et B. L. Shapiro. „Mitochondrial calcium uptake and oxygen consumption in cystic fibrosis“. In : *Nature* 278.5701 (15 mar. 1979), p. 276–277 (cf. p. 40).
- [181]M. J. Stutts, M. R. Knowles, J. T. Gatzky et R. C. Boucher. „Oxygen consumption and ouabain binding sites in cystic fibrosis nasal epithelium“. In : *Pediatric Research* 20.12 (déc. 1986), p. 1316–1320 (cf. p. 40, 42).
- [182]Christian Schwarzer, Beate Illek, Jung H. Suh et al. „Organelle redox of CF and CFTR-corrected airway epithelia“. In : *Free Radical Biology & Medicine* 43.2 (15 juil. 2007), p. 300–316 (cf. p. 40).
- [183]Leonard W. Velsor, Chirag Kariya, Remy Kachadourian et Brian J. Day. „Mitochondrial oxidative stress in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 35.5 (nov. 2006), p. 579–586 (cf. p. 40, 42, 43).

- [184] Mairead Kelly-Aubert, Stéphanie Trudel, Janine Fritsch et al. „GSH monoethyl ester rescues mitochondrial defects in cystic fibrosis models“. In : *Human Molecular Genetics* 20.14 (15 juil. 2011), p. 2745–2759 (cf. p. 40, 42).
- [185] Giovanni Ciabattoni, Giovanni Davì, Mirella Collura et al. „In Vivo Lipid Peroxidation and Platelet Activation in Cystic Fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162.4 (oct. 2000), p. 1195–1201 (cf. p. 40).
- [186] Nina Dickerhof, John F. Pearson, Teagan S. Hoskin et al. „Oxidative stress in early cystic fibrosis lung disease is exacerbated by airway glutathione deficiency“. In : *Free Radical Biology and Medicine* 113 (déc. 2017), p. 236–243 (cf. p. 41).
- [187] S. Mangione, D. D. Patel, B. R. Levin et S. B. Fiel. „Erythrocytic glutathione in cystic fibrosis. A possible marker of pulmonary dysfunction“. In : *Chest* 105.5 (mai 1994), p. 1470–1473 (cf. p. 41).
- [188] Russell P. Bowler et James D. Crapo. „Oxidative stress in airways : is there a role for extracellular superoxide dismutase?“ In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166.12 (15 déc. 2002), S38–43 (cf. p. 41).
- [189] Russell P. Bowler, Mike Nicks, Karen Tran et al. „Extracellular superoxide dismutase attenuates lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31.4 (oct. 2004), p. 432–439 (cf. p. 41).
- [190] D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson et al. „Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis“. In : *Nature* 362.6415 (4 mar. 1993), p. 59–62 (cf. p. 41).
- [191] Annekathrin Moller, Claudia S. Bauer, Rebecca N. Cohen, Christopher P. Webster et Kurt J. De Vos. „Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant SOD1 inhibits anterograde axonal transport of mitochondria by reducing Miro1 levels“. In : *Human Molecular Genetics* (14 sept. 2017) (cf. p. 41).
- [192] B. H. Robinson. „The role of manganese superoxide dismutase in health and disease“. In : *Journal of Inherited Metabolic Disease* 21.5 (août 1998), p. 598–603 (cf. p. 41).
- [193] J. Ju, W. Chen, Y. Lai et al. „Astragalus polysaccharides improve cardiomyopathy in STZ-induced diabetic mice and heterozygous (SOD2+/-) knockout mice“. In : *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 50.8 (10 juil. 2017), e6204 (cf. p. 41).
- [194] L. J. Smith, M. Shamsuddin, P. H. Sporn, M. Denenberg et J. Anderson. „Reduced superoxide dismutase in lung cells of patients with asthma“. In : *Free Radical Biology & Medicine* 22.7 (1997), p. 1301–1307 (cf. p. 41).
- [195] Casilda Oliveira, Alicia Padilla, Antonio Dorado et al. „Inflammation and Oxidation Biomarkers in Patients with Cystic Fibrosis : The Influence of Azithromycin“. In : *The Eurasian Journal of Medicine* 49.2 (6 juin 2017), p. 118–123 (cf. p. 41, 47).

- [196] Gary C. Mouradian, Rohit Gaurav, Steve Pugliese et al. „Superoxide Dismutase 3 R213G Single-Nucleotide Polymorphism Blocks Murine Bleomycin-Induced Fibrosis and Promotes Resolution of Inflammation“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 56.3 (mar. 2017), p. 362–371 (cf. p. 41).
- [197] Russell P. Bowler, John Arcaroli, Edward Abraham et al. „Evidence for extracellular superoxide dismutase as a mediator of hemorrhage-induced lung injury“. In : *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 284.4 (avr. 2003), p. L680–687 (cf. p. 41).
- [198] S. L. Marklund. „Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 267.10 (5 avr. 1992), p. 6696–6701 (cf. p. 41).
- [199] B. L. Shapiro. „Evidence for a mitochondrial lesion in cystic fibrosis“. In : *Life Sciences* 44.19 (1989), p. 1327–1334 (cf. p. 42).
- [200] A. Chomyn. „Mitochondrial genetic control of assembly and function of complex I in mammalian cells“. In : *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33.3 (juin 2001), p. 251–257 (cf. p. 42).
- [201] L. A. Esposito, S. Melov, A. Panov, B. A. Cottrell et D. C. Wallace. „Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress“. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96.9 (27 avr. 1999), p. 4820–4825 (cf. p. 42).
- [202] B. L. Shapiro et L. F. Lam. „Intracellular calcium in cystic fibrosis heterozygotes“. In : *Life Sciences* 40.24 (15 juin 1987), p. 2361–2366 (cf. p. 42).
- [203] R. J. Feigal et B. L. Shapiro. „Cystic fibrosis—a lethal exocrinopathy with altered mitochondrial calcium metabolism“. In : *Annals of the New York Academy of Sciences* 488 (1986), p. 82–98 (cf. p. 42).
- [204] Fabrice Antigny, Nathalie Girardin, Dorothée Raveau et al. „Dysfunction of mitochondria Ca²⁺ uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells“. In : *Mitochondrion* 9.4 (juil. 2009), p. 232–241 (cf. p. 42).
- [205] Angel Gabriel Valdivieso et Tomás A. Santa-Coloma. „CFTR activity and mitochondrial function“. In : *Redox Biology* 1 (5 fév. 2013), p. 190–202 (cf. p. 43).
- [206] Andrés Rab, Rafal Bartoszewski, Asta Jurkuvenaite et al. „Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression“. In : *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 292.2 (fév. 2007), p. C756–766 (cf. p. 43, 46).
- [207] Catherine Verhaeghe, Caroline Remouchamps, Benoît Hennuy et al. „Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways“. In : *Biochemical Pharmacology* 73.12 (15 juin 2007), p. 1982–1994 (cf. p. 43).

- [208]Bozena Kaminska. „MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits“. In : *Biochimica Et Biophysica Acta* 1754.1 (30 déc. 2005), p. 253–262 (cf. p. 43).
- [209]Tomris Ozben. „Oxidative stress and apoptosis : impact on cancer therapy“. In : *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96.9 (sept. 2007), p. 2181–2196 (cf. p. 43).
- [210]Edwina Naik et Vishva M. Dixit. „Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production : Figure 1.“ In : *The Journal of Experimental Medicine* 208.3 (14 mar. 2011), p. 417–420 (cf. p. 43).
- [211]Nannan Zhang. „Inflammation and reactive oxygen species in cardiovascular disease“. In : *World Journal of Cardiology* 2.12 (2010), p. 408 (cf. p. 43).
- [212]Barry R. Imhoff et Jason M. Hansen. „Extracellular redox status regulates Nrf2 activation through mitochondrial reactive oxygen species“. In : *The Biochemical Journal* 424.3 (10 déc. 2009), p. 491–500 (cf. p. 43, 47).
- [213]Z Liu, Y Lv, N Zhao, G Guan et J Wang. „Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate“. In : *Cell Death and Disease* 6.7 (30 juil. 2015), e1822 (cf. p. 44).
- [214]Peng Wang, Jingzhi Li et Bingdong Sha. „The ER stress sensor PERK luminal domain functions as a molecular chaperone to interact with misfolded proteins“. In : *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* 72.12 (1^{er} déc. 2016), p. 1290–1297 (cf. p. 44, 47).
- [215]Yoshimi Sato, Satomi Nadanaka, Tetsuya Okada, Katsuya Okawa et Kazutoshi Mori. „Luminal domain of ATF6 alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi apparatus“. In : *Cell Structure and Function* 36.1 (2011), p. 35–47 (cf. p. 44).
- [216]Jingshi Shen et Ron Prywes. „Dependence of Site-2 Protease Cleavage of ATF6 on Prior Site-1 Protease Digestion Is Determined by the Size of the Luminal Domain of ATF6“. In : *Journal of Biological Chemistry* 279.41 (8 oct. 2004), p. 43046–43051 (cf. p. 44).
- [217]G. P. Solis, Y. Schrock, N. Hulsbusch et al. „Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking“. In : *Molecular Biology of the Cell* 23.10 (15 mai 2012), p. 1812–1825 (cf. p. 44, 58).
- [218]J. Nikawa et S. Yamashita. „IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*“. In : *Molecular Microbiology* 6.11 (juin 1992), p. 1441–1446 (cf. p. 45).
- [219]Yukio Kimata, Yuki Ishiwata-Kimata, Tatsuhiko Ito et al. „Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins“. In : *The Journal of Cell Biology* 179.1 (8 oct. 2007), p. 75–86 (cf. p. 45).
- [220]Yani Chen et Federica Brandizzi. „IRE1 : ER stress sensor and cell fate executor“. In : *Trends in Cell Biology* 23.11 (nov. 2013), p. 547–555 (cf. p. 45, 46).

- [221]Carla M. Pedrosa Ribeiro, Anthony M. Paradiso, Ute Schwab et al. „Chronic Airway Infection/Inflammation Induces a Ca^{2+}_i -dependent Hyperinflammatory Response in Human Cystic Fibrosis Airway Epithelia“. In : *Journal of Biological Chemistry* 280.18 (6 mai 2005), p. 17798–17806 (cf. p. 47).
- [222]Carla M. Pedrosa Ribeiro, Anthony M. Paradiso, Mark A. Carew, Stephen B. Shears et Richard C. Boucher. „Cystic Fibrosis Airway Epithelial Ca^{2+}_i Signaling : THE MECHANISM FOR THE LARGER AGONIST-MEDIATED Ca^{2+}_i SIGNALS IN HUMAN CYSTIC FIBROSIS AIRWAY EPITHELIA“. In : *Journal of Biological Chemistry* 280.11 (18 mar. 2005), p. 10202–10209 (cf. p. 47).
- [223]C. M. P. Ribeiro et R. C. Boucher. „Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Cystic Fibrosis-Related Airway Inflammatory Responses“. In : *Proceedings of the American Thoracic Society* 7.6 (1^{er} nov. 2010), p. 387–394 (cf. p. 47).
- [224]Mary E. B. Martino, John C. Olsen, Nanette B. Fulcher et al. „Airway Epithelial Inflammation-induced Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Store Expansion Is Mediated by X-box Binding Protein-1“. In : *Journal of Biological Chemistry* 284.22 (29 mai 2009), p. 14904–14913 (cf. p. 47).
- [225]Ari Helenius et Markus Aebi. „Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum“. In : *Annual Review of Biochemistry* 73.1 (juin 2004), p. 1019–1049 (cf. p. 47).
- [226]Caroline Norez, Sabrina Noel, Martina Wilke et al. „Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat“. In : *FEBS letters* 580.8 (3 avr. 2006), p. 2081–2086 (cf. p. 47, 108).
- [227]O. Tabary, S. Escotte, J. P. Couetil et al. „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“. In : *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164.6 (15 mar. 2000), p. 3377–3384 (cf. p. 47).
- [228]T. L. Bonfield, M. W. Konstan et M. Berger. „Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis“. In : *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 104.1 (juil. 1999), p. 72–78 (cf. p. 47).
- [229]Dean P. Jones, Vito C. Mody, Joanne L. Carlson, Michael J. Lynn et Paul Sternberg. „Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses“. In : *Free Radical Biology & Medicine* 33.9 (1^{er} nov. 2002), p. 1290–1300 (cf. p. 47).
- [230]Jocelyn R. Grunwell, Scott E. Gillespie, Janine M. Ward et al. „Comparison of Glutathione, Cysteine, and Their Redox Potentials in the Plasma of Critically Ill and Healthy Children“. In : *Frontiers in Pediatrics* 3 (26 mai 2015) (cf. p. 47).
- [231]Shunai Jiang, Siobhan E. Moriarty-Craige, Michael Orr et al. „Oxidant-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells : dependence on extracellular redox state“. In : *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46.3 (mar. 2005), p. 1054–1061 (cf. p. 47).

- [232] Gabriel Oliveira, Casilda Oliveira, Antonio Dorado et al. „Cellular and plasma oxidative stress biomarkers are raised in adults with bronchiectasis“. In : *Clinical Nutrition* 32.1 (fév. 2013), p. 112–117 (cf. p. 48).
- [233] R. K. Brown, H. Wyatt, J. F. Price et F. J. Kelly. „Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress“. In : *The European Respiratory Journal* 9.2 (fév. 1996), p. 334–339 (cf. p. 48).
- [234] Li Li et Shawn Somerset. „Digestive system dysfunction in cystic fibrosis : Challenges for nutrition therapy“. In : *Digestive and Liver Disease* 46.10 (oct. 2014), p. 865–874 (cf. p. 48).
- [235] Dilina Marreiro, Kyria Cruz, Jennifer Morais et al. „Zinc and Oxidative Stress : Current Mechanisms“. In : *Antioxidants* 6.2 (29 mar. 2017), p. 24 (cf. p. 48).
- [236] R. C. Hansen, R. Lemen et B. Revsin. „Cystic fibrosis manifesting with acrodermatitis enteropathica-like eruption. Association with essential fatty acid and zinc deficiencies“. In : *Archives of Dermatology* 119.1 (jan. 1983), p. 51–55 (cf. p. 48).
- [237] Nancy F Krebs, Jamie E Westcott, Thomas D Arnold et al. „Abnormalities in Zinc Homeostasis in Young Infants with Cystic Fibrosis“. In : *Pediatric Research* 48.2 (août 2000), p. 256–261 (cf. p. 48).
- [238] Susana Puntarulo. „Iron, oxidative stress and human health“. In : *Molecular Aspects of Medicine* 26.4 (août 2005), p. 299–312 (cf. p. 48).
- [239] David W. Reid, Nicholas J. Withers, Libby Francis, John W. Wilson et Thomas C. Kotsimbos. „Iron deficiency in cystic fibrosis : relationship to lung disease severity and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection“. In : *Chest* 121.1 (jan. 2002), p. 48–54 (cf. p. 48).
- [240] Moon Jeong Lee, Jessica A. Alvarez, Ellen M. Smith et al. „Changes in Mineral Micronutrient Status During and After Pulmonary Exacerbation in Adults With Cystic Fibrosis“. In : *Nutrition in Clinical Practice* 30.6 (déc. 2015), p. 838–843 (cf. p. 48).
- [241] Janet Y. Uriu-Adams, Robert B. Rucker, Joel F. Commisso et Carl L. Keen. „Diabetes and dietary copper alter ⁶⁷Cu metabolism and oxidant defense in the rat“. In : *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16.5 (mai 2005), p. 312–320 (cf. p. 48).
- [242] Nathan E. Hellman et Jonathan D. Gitlin. „CERULOPLASMIN METABOLISM AND FUNCTION“. In : *Annual Review of Nutrition* 22.1 (juil. 2002), p. 439–458 (cf. p. 48).
- [243] P. J. Twomey. „Relationship between Serum Copper, Ceruloplasmin, and Non-Ceruloplasmin-Bound Copper in Routine Clinical Practice“. In : *Clinical Chemistry* 51.8 (1^{er} août 2005), p. 1558–1559 (cf. p. 48).
- [244] J. J. Strain. „Newer aspects of micronutrients in chronic disease : copper“. In : *The Proceedings of the Nutrition Society* 53.3 (nov. 1994), p. 583–598 (cf. p. 48).

- [245]Y. Chen, J. T. Saari et Y. J. Kang. „Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage in copper-deficient rats“. In : *Free Radical Biology & Medicine* 17.6 (déc. 1994), p. 529–536 (cf. p. 48).
- [246]Jianfei Jiang, Claudette M. St Croix, Nancy Sussman et al. „Contribution of glutathione and metallothioneins to protection against copper toxicity and redox cycling : quantitative analysis using MT+/+ and MT-/- mouse lung fibroblast cells“. In : *Chemical Research in Toxicology* 15.8 (août 2002), p. 1080–1087 (cf. p. 48).
- [247]Lucía Tapia, Mauricio González-Agüero, Mónica F. Cisternas et al. „Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels“. In : *Biochemical Journal* 378.2 (1^{er} mar. 2004), p. 617–624 (cf. p. 48).
- [248]Y. Chen, J. T. Saari et Y. J. Kang. „Expression of gamma-glutamylcysteine synthetase in the liver of copper-deficient rats“. In : *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 210.2 (nov. 1995), p. 102–106 (cf. p. 48).
- [249]E. B. Maryon, S. A. Molloy et J. H. Kaplan. „Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1“. In : *AJP : Cell Physiology* 304.8 (15 avr. 2013), p. C768–C779 (cf. p. 48).
- [250]S. S. Percival, G. P. Kauwell, E. Bowser et M. Wagner. „Altered copper status in adult men with cystic fibrosis“. In : *Journal of the American College of Nutrition* 18.6 (déc. 1999), p. 614–619 (cf. p. 48, 49).
- [251]Joseph A. Cotruvo, Allegra T. Aron, Karla M. Ramos-Torres et Christopher J. Chang. „Synthetic fluorescent probes for studying copper in biological systems“. In : *Chemical Society Reviews* 44.13 (7 juil. 2015), p. 4400–4414 (cf. p. 49).
- [252]Marijke Jozefczak, Tony Remans, Jaco Vangronsveld et Ann Cuypers. „Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses“. In : *International Journal of Molecular Sciences* 13.12 (7 mar. 2012), p. 3145–3175 (cf. p. 49).
- [253]Maria Iskra et Waclaw Majewski. „Copper and Zinc Concentrations and the Activities of Ceruloplasmin and Superoxide Dismutase in Atherosclerosis Obliterans“. In : *Biological Trace Element Research* 73.1 (2000), p. 55–66 (cf. p. 49).
- [254]J. B. Hilton, A. R. White et P. J. Crouch. „Endogenous Cu in the central nervous system fails to satiate the elevated requirement for Cu in a mutant SOD1 mouse model of ALS“. In : *Metallomics : Integrated Biometal Science* 8.9 (1^{er} sept. 2016), p. 1002–1011 (cf. p. 49).
- [255]Hans Gerhard Creutzfeld. „Ueber eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems“. In : *Z. ges. Neurol. Psychiat* 4722.57 (1920), p. 1–18 (cf. p. 51).
- [256]A. Jakob. „Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswerthem anatomischen befunde“. In : *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 64.1 (1^{er} déc. 1921), p. 147–228 (cf. p. 51).

- [257]J. Cuille et PL. Chelle. „Investigations of scrapie in sheep“. In : *Vet Med* 34 (1938), p. 417–8 (cf. p. 51).
- [258]Adriano Aguzzi, Frank Baumann et Juliane Bremer. „The prion’s elusive reason for being“. In : *Annual Review of Neuroscience* 31 (2008), p. 439–477 (cf. p. 51).
- [259]D. C. Gajdusek et V. Zigas. „Kuru ; clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the Eastern Highlands of New Guinea“. In : *The American Journal of Medicine* 26.3 (mar. 1959), p. 442–469 (cf. p. 52).
- [260]C. J. Gibbs, D. C. Gajdusek, D. M. Asher et al. „Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy) : transmission to the chimpanzee“. In : *Science (New York, N.Y.)* 161.3839 (26 juil. 1968), p. 388–389 (cf. p. 52).
- [261]E. Beck, P. M. Daniel, W. B. Matthews et al. „Creutzfeldt-Jakob disease. The neuropathology of a transmission experiment“. In : *Brain : A Journal of Neurology* 92.4 (1969), p. 699–716 (cf. p. 52).
- [262]J. S. Griffith. „Self-replication and scrapie“. In : *Nature* 215.5105 (2 sept. 1967), p. 1043–1044 (cf. p. 52).
- [263]S. B. Prusiner. „Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie“. In : *Science (New York, N.Y.)* 216.4542 (9 avr. 1982), p. 136–144 (cf. p. 52).
- [264]S. B. Prusiner, D. C. Bolton, D. F. Groth et al. „Further purification and characterization of scrapie prions“. In : *Biochemistry* 21.26 (21 déc. 1982), p. 6942–6950 (cf. p. 52).
- [265]S. B. Prusiner, S. P. Cochran, D. F. Groth et al. „Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay“. In : *Annals of Neurology* 11.4 (avr. 1982), p. 353–358 (cf. p. 52).
- [266]S. B. Prusiner, M. P. McKinley, K. A. Bowman et al. „Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods“. In : *Cell* 35.2 (déc. 1983), p. 349–358 (cf. p. 52).
- [267]D. C. Bolton, M. P. McKinley et S. B. Prusiner. „Identification of a protein that purifies with the scrapie prion“. In : *Science (New York, N.Y.)* 218.4579 (24 déc. 1982), p. 1309–1311 (cf. p. 52).
- [268]B. Chesebro, R. Race, K. Wehrly et al. „Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain“. In : *Nature* 315.6017 (23 mai 1985), p. 331–333 (cf. p. 52).
- [269]S. B. Prusiner, D. F. Groth, D. C. Bolton, S. B. Kent et L. E. Hood. „Purification and structural studies of a major scrapie prion protein“. In : *Cell* 38.1 (août 1984), p. 127–134 (cf. p. 52).
- [270]D. A. Harris. „Cellular biology of prion diseases“. In : *Clinical Microbiology Reviews* 12.3 (juil. 1999), p. 429–444 (cf. p. 52).

- [271] Stanley B Prusiner, Michael R Scott, Stephen J DeArmond et Fred E Cohen. „Prion Protein Biology“. In : *Cell* 93.3 (mai 1998), p. 337–348 (cf. p. 52).
- [272] K. M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen et al. „Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.“ In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.23 (1^{er} déc. 1993), p. 10962–10966 (cf. p. 52).
- [273] Federico Benetti et Giuseppe Legname. „De novo mammalian prion synthesis“. In : *Prion* 3.4 (oct. 2009), p. 213–219 (cf. p. 53).
- [274] Caroline J. Atkinson, Kai Zhang, Alan L. Munn, Adrian Wiegmans et Ming Q. Wei. „Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein“. In : *Prion* 10.1 (2 jan. 2016), p. 63–82 (cf. p. 53, 137).
- [275] B. Oesch, D. Westaway, M. Wälchli et al. „A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein“. In : *Cell* 40.4 (avr. 1985), p. 735–746 (cf. p. 54).
- [276] R. S. Sparkes, M. Simon, V. H. Cohn et al. „Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes“. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83.19 (oct. 1986), p. 7358–7362 (cf. p. 54).
- [277] I. Y. Lee, D. Westaway, A. F. Smit et al. „Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species“. In : *Genome Research* 8.10 (oct. 1998), p. 1022–1037 (cf. p. 54).
- [278] Izabela Zawlik, Monika Witusik, Krystyna Hulas-Bigoszewska et al. „Regulation of PrPC expression : Nerve growth factor (NGF) activates the prion gene promoter through the MEK1 pathway in PC12 cells“. In : *Neuroscience Letters* 400.1 (mai 2006), p. 58–62 (cf. p. 54).
- [279] Lorena Varela-Nallar, Enrique M. Toledo, Marcelo A. Chacón et Nivaldo C. Inestrosa. „The functional links between prion protein and copper“. In : *Biological Research* 39.1 (2006), p. 39–44 (cf. p. 54).
- [280] L. Varela-Nallar. „Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons“. In : *AJP : Cell Physiology* 290.1 (1^{er} juin 2005), p. C271–C281 (cf. p. 54).
- [281] Roland Riek, Simone Hornemann, Gerhard Wider et al. „NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121–231)“. In : *Nature* 382.6587 (juil. 1996), p. 180–182 (cf. p. 54).
- [282] R. Zahn, A. Liu, T. Lührs et al. „NMR solution structure of the human prion protein“. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97.1 (4 jan. 2000), p. 145–150 (cf. p. 54).
- [283] Colin S. Burns, Eliah Aronoff-Spencer, Christine M. Dunham et al. „Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein“. In : *Biochemistry* 41.12 (26 mar. 2002), p. 3991–4001 (cf. p. 54).

- [284] Christopher F. Harrison, Victoria A. Lawson, Bradley M. Coleman et al. „Conservation of a Glycine-rich Region in the Prion Protein Is Required for Uptake of Prion Infectivity“. In : *Journal of Biological Chemistry* 285.26 (25 juin 2010), p. 20213–20223 (cf. p. 55).
- [285] Alain Mangé et Sylvain Lehmann. „Nouveaux aspects de la biologie de la protéine prion*“. In : *M/S : médecine sciences* 18.12 (2002), p. 1267–1275 (cf. p. 55–57).
- [286] J. Manson, J. D. West, V. Thomson et al. „The prion protein gene : a role in mouse embryogenesis?“ In : *Development (Cambridge, England)* 115.1 (mai 1992), p. 117–122 (cf. p. 55).
- [287] D. A. Harris, P. Lele et W. D. Snider. „Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization“. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90.9 (1^{er} mai 1993), p. 4309–4313 (cf. p. 55).
- [288] M. Moser, R. J. Colello, U. Pott et B. Oesch. „Developmental expression of the prion protein gene in glial cells“. In : *Neuron* 14.3 (mar. 1995), p. 509–517 (cf. p. 55).
- [289] M. J. Ford, L. J. Burton, R. J. Morris et S. M. Hall. „Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse“. In : *Neuroscience* 113.1 (2002), p. 177–192 (cf. p. 55).
- [290] Qi Shi et Xiao-Ping Dong. „^{Ctm} PrP and ER stress : A neurotoxic mechanism of some special PrP mutants“. In : *Prion* 5.3 (juil. 2011), p. 123–125 (cf. p. 56).
- [291] Richard S. Stewart et David A. Harris. „Most Pathogenic Mutations Do Not Alter the Membrane Topology of the Prion Protein“. In : *Journal of Biological Chemistry* 276.3 (19 jan. 2001), p. 2212–2220 (cf. p. 56).
- [292] R. S. Hegde, J. A. Mastrianni, M. R. Scott et al. „A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease“. In : *Science (New York, N.Y.)* 279.5352 (6 fév. 1998), p. 827–834 (cf. p. 56).
- [293] David A. Harris. „Trafficking, turnover and membrane topology of PrP“. In : *British Medical Bulletin* 66 (2003), p. 71–85 (cf. p. 56).
- [294] Peter J. Peters, Alexander Mironov, David Peretz et al. „Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway“. In : *The Journal of Cell Biology* 162.4 (18 août 2003), p. 703–717 (cf. p. 56).
- [295] Pedro Viegas, Nathalie Chaverot, Hervé Enslin et al. „Junctional expression of the prion protein PrP^C by brain endothelial cells : a role in trans-endothelial migration of human monocytes“. In : *Journal of Cell Science* 119 (Pt 22 15 nov. 2006), p. 4634–4643 (cf. p. 58).
- [296] Etienne Morel, Stéphane Fouquet, Danielle Chateau et al. „The cellular prion protein PrP^C is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 279.2 (9 jan. 2004), p. 1499–1505 (cf. p. 58).

- [297] Etienne Morel, Stéphane Fouquet, Carine Strup-Perrot et al. „The Cellular Prion Protein PrP^c Is Involved in the Proliferation of Epithelial Cells and in the Distribution of Junction-Associated Proteins“. In : *PLoS ONE* 3.8 (20 août 2008). Sous la dir. de Neil Hotchin, e3000 (cf. p. 58).
- [298] Constance S. V. Petit, Frédérick Barreau, Laura Besnier et al. „Requirement of cellular prion protein for intestinal barrier function and mislocalization in patients with inflammatory bowel disease“. In : *Gastroenterology* 143.1 (juil. 2012), 122–132.e15 (cf. p. 58, 61).
- [299] Claire Sunyach, Angela Jen, Juelin Deng et al. „The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein“. In : *The EMBO journal* 22.14 (15 juil. 2003), p. 3591–3601 (cf. p. 58).
- [300] David R. Taylor, Nicole T. Watt, W. Sumudhu S. Perera et Nigel M. Hooper. „Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis“. In : *Journal of Cell Science* 118 (Pt 21 1^{er} nov. 2005), p. 5141–5153 (cf. p. 58).
- [301] Adrian R. Walmsley, Fanning Zeng et Nigel M. Hooper. „The N-terminal region of the prion protein ectodomain contains a lipid raft targeting determinant“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 278.39 (26 sept. 2003), p. 37241–37248 (cf. p. 58).
- [302] Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida, Kazuto Shigematsu et al. „Deletion of N-terminal residues 23-88 from prion protein (PrP) abrogates the potential to rescue PrP-deficient mice from PrP-like protein/doppel-induced Neurodegeneration“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 278.31 (1^{er} août 2003), p. 28944–28949 (cf. p. 58).
- [303] Bettina Drisaldi, Janaky Coomaraswamy, Peter Mastrangelo et al. „Genetic mapping of activity determinants within cellular prion proteins : N-terminal modules in PrP^c offset pro-apoptotic activity of the Doppel helix B/B' region“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 279.53 (31 déc. 2004), p. 55443–55454 (cf. p. 58).
- [304] D. Shmerling, I. Hegyi, M. Fischer et al. „Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions“. In : *Cell* 93.2 (17 avr. 1998), p. 203–214 (cf. p. 58).
- [305] Jiyan Ma, Robert Wollmann et Susan Lindquist. „Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol“. In : *Science (New York, N.Y.)* 298.5599 (29 nov. 2002), p. 1781–1785 (cf. p. 59).
- [306] Angelika S. Rambold, Margit Miesbauer, Doron Rapaport et al. „Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP“. In : *Molecular Biology of the Cell* 17.8 (août 2006), p. 3356–3368 (cf. p. 59).
- [307] D. R. Brown. „Prion and prejudice : normal protein and the synapse“. In : *Trends in Neurosciences* 24.2 (fév. 2001), p. 85–90 (cf. p. 59, 61).

- [308]D. R. Brown, B. S. Wong, F. Hafiz et al. „Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase“. In : *The Biochemical Journal* 344 Pt 1 (15 nov. 1999), p. 1–5 (cf. p. 59).
- [309]D. R. Brown, W. J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt et H. A. Kretzschmar. „Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity“. In : *Experimental Neurology* 146.1 (juil. 1997), p. 104–112 (cf. p. 59).
- [310]B. S. Wong, T. Liu, R. Li et al. „Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein“. In : *Journal of Neurochemistry* 76.2 (jan. 2001), p. 565–572 (cf. p. 59).
- [311]D. R. Brown et A. Besinger. „Prion protein expression and superoxide dismutase activity“. In : *The Biochemical Journal* 334 (Pt 2) (1^{er} sept. 1998), p. 423–429 (cf. p. 59).
- [312]F. Klamt, F. Dal-Pizzol, M. L. Conte da Frota et al. „Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein“. In : *Free Radical Biology & Medicine* 30.10 (15 mai 2001), p. 1137–1144 (cf. p. 59).
- [313]Akikazu Sakudo, Deug-chan Lee, Keiichi Saeki et al. „Impairment of superoxide dismutase activation by N-terminally truncated prion protein (PrP) in PrP-deficient neuronal cell line“. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308.3 (29 août 2003), p. 660–667 (cf. p. 59).
- [314]Barry Halliwell. „Oxidative stress and neurodegeneration : where are we now“. In : *Journal of Neurochemistry* 97.6 (juin 2006), p. 1634–1658 (cf. p. 59).
- [315]Xavier Roucou, Malcolm Gains et Andréa C. LeBlanc. „Neuroprotective functions of prion protein“. In : *Journal of Neuroscience Research* 75.2 (15 jan. 2004), p. 153–161 (cf. p. 59).
- [316]Xavier Roucou et Andréa C. LeBlanc. „Cellular prion protein neuroprotective function : implications in prion diseases“. In : *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 83.1 (jan. 2005), p. 3–11 (cf. p. 59).
- [317]D. R. Brown, K. Qin, J. W. Herms et al. „The cellular prion protein binds copper in vivo“. In : *Nature* 390.6661 (18 déc. 1997), p. 684–687 (cf. p. 59, 61, 62).
- [318]David R. Brown, Richard St J. Nicholas et Laura Canevari. „Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress“. In : *Journal of Neuroscience Research* 67.2 (15 jan. 2002), p. 211–224 (cf. p. 59).
- [319]Marta Turu, Mark Slevin, Priya Ethirajan et al. „The normal cellular prion protein and its possible role in angiogenesis“. In : *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 13 (1^{er} mai 2008), p. 6491–6500 (cf. p. 60).
- [320]Andrew D. Steele, Zhipeng Zhou, Walker S. Jackson et al. „Context dependent neuroprotective properties of prion protein (PrP)“. In : *Prion* 3.4 (déc. 2009), p. 240–249 (cf. p. 60).

- [321]Pauline Gourdain, Clara Ballerini, Arnaud B Nicot et Claude Carnaud. „Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in prion protein (PrP^c)-null mice : evidence for a critical role of the central nervous system“. In : *Journal of Neuroinflammation* 9.1 (déc. 2012) (cf. p. 60).
- [322]Gary R. Martin, Catherine M. Keenan, Keith A. Sharkey et Frank R. Jirik. „Endogenous Prion Protein Attenuates Experimentally Induced Colitis“. In : *The American Journal of Pathology* 179.5 (nov. 2011), p. 2290–2301 (cf. p. 60).
- [323]Ø. Salvesen, M. R. Reiten, A. Espenes et al. „LPS-induced systemic inflammation reveals an immunomodulatory role for the prion protein at the blood-brain interface“. In : *Journal of Neuroinflammation* 14.1 (déc. 2017) (cf. p. 60).
- [324]Gui-Ru Wu, Tian-Chen Mu, Zhen-Xing Gao et al. „Prion protein is required for tumor necrosis factor alpha (TNF)-triggered nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling and cytokine production“. In : *Journal of Biological Chemistry* (12 sept. 2017), jbc.M117.787283 (cf. p. 61).
- [325]Glenn L. Millhauser. „Copper and the prion protein : methods, structures, function, and disease“. In : *Annual Review of Physical Chemistry* 58 (2007), p. 299–320 (cf. p. 61).
- [326]Neville Vassallo et Jochen Herms. „Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse“. In : *Journal of Neurochemistry* 86.3 (août 2003), p. 538–544 (cf. p. 61, 138).
- [327]J. Stöckel, J. Safar, A. C. Wallace, F. E. Cohen et S. B. Prusiner. „Prion protein selectively binds copper(II) ions“. In : *Biochemistry* 37.20 (19 mai 1998), p. 7185–7193 (cf. p. 61).
- [328]Dean P. Jones, Young-Mi Go, Corinna L. Anderson et al. „Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control“. In : *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18.11 (août 2004), p. 1246–1248 (cf. p. 62).
- [329]E. Leclerc, H. Serban, S. B. Prusiner, D. R. Burton et R. A. Williamson. „Copper induces conformational changes in the N-terminal part of cell-surface PrP^c“. In : *Archives of Virology* 151.11 (nov. 2006), p. 2103–2109 (cf. p. 62).
- [330]E. Quaglio, R. Chiesa et D. A. Harris. „Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 276.14 (6 avr. 2001), p. 11432–11438 (cf. p. 62).
- [331]P. C. Pauly et D. A. Harris. „Copper stimulates endocytosis of the prion protein“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 273.50 (11 déc. 1998), p. 33107–33110 (cf. p. 62).
- [332]W. S. Perera et N. M. Hooper. „Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region“. In : *Current biology : CB* 11.7 (3 avr. 2001), p. 519–523 (cf. p. 62).

- [333]Nadia Alfaidy, Sylvain Chauvet, Sandrine Donadio-Andrei et al. „Prion protein expression and functional importance in developmental angiogenesis : role in oxidative stress and copper homeostasis“. In : *Antioxidants & Redox Signaling* 18.4 (1^{er} fév. 2013), p. 400–411 (cf. p. 62, 138, 180).
- [334]D. R. Brown, C. Clive et S. J. Haswell. „Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein“. In : *Journal of Neurochemistry* 76.1 (jan. 2001), p. 69–76 (cf. p. 62).
- [335]R. C. Boucher. „An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease“. In : *Advanced Drug Delivery Reviews* 54.11 (5 déc. 2002), p. 1359–1371 (cf. p. 67).
- [336]M. H. Akabas. „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel“. In : *The Journal of Biological Chemistry* 275.6 (11 fév. 2000), p. 3729–3732 (cf. p. 67).
- [337]G. L. Lukacs, A. Mohamed, N. Kartner et al. „Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP“. In : *The EMBO journal* 13.24 (15 déc. 1994), p. 6076–6086 (cf. p. 67).
- [338]Harry Heijerman. „Infection and inflammation in cystic fibrosis : A short review“. In : *Journal of Cystic Fibrosis* 4 (août 2005), p. 3–5 (cf. p. 67).
- [339]Carolyn J. Dakin, Andrew H. Numa, He Wang et al. „Inflammation, Infection, and Pulmonary Function in Infants and Young Children with Cystic Fibrosis“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165.7 (avr. 2002), p. 904–910 (cf. p. 67).
- [340]Marianne S. Muhlebach, Paul W. Stewart, Margaret W. Leigh et Terry L. Noah. „Quantitation of Inflammatory Responses to Bacteria in Young Cystic Fibrosis and Control Patients“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160.1 (juil. 1999), p. 186–191 (cf. p. 67).
- [341]Oana Ciofu, Tim Tolker-Nielsen, Peter Østrup Jensen, Hengzhuang Wang et Niels Høiby. „Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients“. In : *Advanced Drug Delivery Reviews* 85 (mai 2015), p. 7–23 (cf. p. 107).
- [342]Sarath C. Ranganathan, Graham L. Hall, Peter D. Sly et al. „Early Lung Disease in Infants and Preschool Children with Cystic Fibrosis. What Have We Learned and What Should We Do about It?“ In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 195.12 (15 juin 2017), p. 1567–1575 (cf. p. 107).
- [343]Marie E. Egan, Marilyn Pearson, Scott A. Weiner et al. „Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects“. In : *Science (New York, N.Y.)* 304.5670 (23 avr. 2004), p. 600–602 (cf. p. 108, 135).
- [344]B. Illek, H. Fischer, G. F. Santos et al. „cAMP-independent activation of CFTR Cl channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein“. In : *The American Journal of Physiology* 268.4 (avr. 1995), p. C886–893 (cf. p. 108).

- [345]R. C. Rubenstein, M. E. Egan et P. L. Zeitlin. „In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR“. In : *The Journal of Clinical Investigation* 100.10 (15 nov. 1997), p. 2457–2465 (cf. p. 108, 135).
- [346]R. C. Rubenstein et P. L. Zeitlin. „A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients : partial restoration of nasal epithelial CFTR function“. In : *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157.2 (fév. 1998), p. 484–490 (cf. p. 108).
- [347]Malgorzata S. Cartiera, Elisa C. Ferreira, Christina Caputo et al. „Partial correction of cystic fibrosis defects with PLGA nanoparticles encapsulating curcumin“. In : *Molecular Pharmaceutics* 7.1 (1^{er} fév. 2010), p. 86–93 (cf. p. 108).
- [348]Alan S. Verkman, Aleksander Edelman, Margarida Amaral et al. „Finding new drugs to enhance anion secretion in cystic fibrosis : Toward suitable systems for better drug screening. Report on the pre-conference meeting to the 12th ECFS Basic Science Conference, Albufeira, 25-28 March 2015“. In : *Journal of Cystic Fibrosis : Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 14.6 (nov. 2015), p. 700–705 (cf. p. 108).
- [349]J. P. Clancy, Steven M. Rowe, Frank J. Accurso et al. „Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation“. In : *Thorax* 67.1 (jan. 2012), p. 12–18 (cf. p. 108).
- [350]Jessica E. Pittman, Kristine M. Wylie, Kathryn Akers et al. „Association of Antibiotics, Airway Microbiome, and Inflammation in Infants with Cystic Fibrosis“. In : *Annals of the American Thoracic Society* 14.10 (oct. 2017), p. 1548–1555 (cf. p. 134).
- [351]Oula Khoury, Christopher Barrios, Victor Ortega, Anthony Atala et Sean V. Murphy. „Immunomodulatory Cell Therapy to Target Cystic Fibrosis Inflammation“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (14 juil. 2017) (cf. p. 134).
- [352]Salvatore Carrabino, Daniela Carpani, Alessandra Livraghi et al. „Dysregulated interleukin-8 secretion and NF-kappaB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells“. In : *Journal of Cystic Fibrosis : Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* 5.2 (mai 2006), p. 113–119 (cf. p. 134).
- [353]Tip W. Loo, M. Claire Bartlett et David M. Clarke. „Thapsigargin or curcumin does not promote maturation of processing mutants of the ABC transporters, CFTR, and P-glycoprotein“. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325.2 (10 déc. 2004), p. 580–585 (cf. p. 135).
- [354]Caroline Norez, Fabrice Antigny, Sabrina Noel, Clarisse Vandebrouck et Frédéric Becq. „A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype“. In : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 41.2 (août 2009), p. 217–225 (cf. p. 135).

- [355] Andrew R. Castle et Andrew C. Gill. „Physiological Functions of the Cellular Prion Protein“. In : *Frontiers in Molecular Biosciences* 4 (2017), p. 19 (cf. p. 137).
- [356] Laura Westergard, Heather M. Christensen et David A. Harris. „The cellular prion protein (PrP^C) : Its physiological function and role in disease“. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772.6 (juin 2007), p. 629–644 (cf. p. 137).
- [357] Constance S.V. Petit, Laura Besnier, Etienne Morel, Monique Rousset et Sophie Thenet. „Roles of the cellular prion protein in the regulation of cell-cell junctions and barrier function“. In : *Tissue Barriers* 1.2 (avr. 2013), e24377 (cf. p. 138).
- [358] Marco A. M. Prado, Juliana Alves-Silva, Ana C. Magalhães et al. „PrP^C on the road : trafficking of the cellular prion protein“. In : *Journal of Neurochemistry* 88.4 (fév. 2004), p. 769–781 (cf. p. 180).

Abstract:

In cystic fibrosis (CF), inflammation is detected early on in the airways, even before the onset of bacterial infection, suggesting that mechanisms other than infection are at the origin of the initial inflammatory processes. Among these processes, there is the oxidative stress. The latter is widely accepted as a critical component of several diseases.

My PhD project was focused on the characterization of the role of the oxidative stress in triggering inflammation in the CF disease. I used normal (HBE) and cystic fibrosis (CFBE) human bronchial epithelial cells. I also used two cell models derived from CFBE upon either, a stable expression of the wild-type protein (CFBE-wt), or its mutant form; delF508 (CFBE-deltaF508).

The characterization of the inflammatory profile in our cellular models confirmed the presence of an intrinsic inflammation in CFBE cells. This profile was independent of the expression of the CFTR protein and was not modified upon the treatments with different molecules known to correct the trafficking of the mutant CFTR (delF508) protein. This suggest that other parameters might be the cause of the CF intrinsic inflammation.

Recent studies from our group showed that cells from bronchial CF patients displayed a decrease in copper (Cu) concentrations, and increase in the production of free radicals, and a decrease in antioxidant enzyme activities, such as Cu/Zn-SOD. These results allowed us to establish a link between Cu levels, oxidative stress and inflammation.

While investigating the levels of expression of a number of genes encoding proteins that control Cu homeostasis in HBE and CFBE cells, we found that the expression of the cellular prion protein (PrP^C) was altered in CFBE cells. PrP^C is a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored glycoprotein involved in prion infection, propagation and aggregation in the central nervous system that leads to transmissible spongiforme encephalopathies (TSE) diseases. Despite several *in vitro* and *in vivo* studies demonstrating the capacity of PrP^C to interact with other proteins, to bind copper (Cu) with high affinity and to protect cells against oxidative stress, its physiological functions were still under investigations, particularly in extra-neuronal tissues, such as the bronchial epithelium. We have addressed the role of PrP^C in the lung cellular architecture, by determining its impact on the integrity of the lung epithelial junctions. This was performed in relation to Cu homeostasis and oxidative stress in bronchial epithelial cells. To further understand PrP^C function, we developed a new HBE PrP^C knock-out cell line using the CRISPR/Cas9 strategy. Overall, my project brought new insights into the understanding copper involvement in inflammation, oxidative stress and junctional barriers, and how PrP^C protein protect bronchial epithelial cells from copper-associated oxidative stress.

Résumé :

La mucoviscidose est une maladie génétique, autosomale et récessive. Elle est caractérisée par une inflammation précoce des voies aériennes observée en absence de toute infection bactérienne, virale ou fongique.

Aujourd'hui, l'origine de cette inflammation précoce reste très discutée. Plusieurs études mettent en avant la participation du stress oxydatif, une composante pathologique majeure de la mucoviscidose. Cependant, le lien entre le stress oxydatif et l'inflammation dans un contexte mucoviscidosique reste à démontrer.

Mon projet de thèse a porté sur la caractérisation du rôle du stress oxydatif dans le déclenchement de l'inflammation dans la mucoviscidose. Pour cela j'ai utilisé des cellules épithéliales bronchiques humaines saines (HBE) et mucoviscidosiques (CFBE). J'ai également utilisé deux modèles de cellules dérivées de la cellule CFBE; les cellules CFBE corrigées par la protéine normale et celles surexprimant la protéine CFTR mutée ; CFTR-delF508 (CFBE-delF508). La caractérisation du profil inflammatoire dans les trois modèles cellulaires a confirmé la présence d'une inflammation intrinsèque dans les cellules CFBE. Cependant, ce profil serait indépendant de l'expression de la protéine CFTR, car il n'est pas modifié suite à l'utilisation de traitements avec des correcteurs de l'expression de la protéine CFTR mutée. Ces résultats suggèrent que le statut inflammatoire dans les cellules mucoviscidosiques serait dû à des protagonistes autres que CFTR.

Des études récentes de notre groupe ont montré que les cellules de patients atteints de mucoviscidose présentent une diminution de la concentration en cuivre (Cu), une augmentation de la production de radicaux libres (ROS) et une diminution des activités enzymatiques anti-oxydantes, notamment celle de la Cu/Zn-SOD. La caractérisation du statut du métal cuivre dans nos modèles, nous a permis d'établir un lien entre les niveaux de Cu, le stress oxydatif et l'inflammation dans la mucoviscidose.

La comparaison des niveaux d'expression de gènes codants pour des protéines impliquées dans l'homéostasie du Cu dans les cellules HBE et CFBE, nous a permis d'identifier la protéine prion cellulaire (PrP^C) comme protéine surexprimée dans les cellules CFBE. PrP^C est une glycoprotéine ancrée à la surface des cellules grâce à son ancre Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI). Plusieurs études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré la capacité du PrP^C à interagir avec différentes protéines, à lier le Cu avec une forte affinité, et à protéger les cellules contre le stress oxydatif. Néanmoins, ses fonctions restent à caractériser dans des tissus extra-neuronaux comme l'épithélium bronchique.

Nous avons étudié le rôle de la protéine PrP^C dans le contrôle de l'homéostasie du Cu et du stress oxydatif dans les cellules épithéliales bronchiques. Nous avons aussi étudié son implication dans le contrôle des jonctions cellulaires des cellules pulmonaires. Afin de mieux comprendre la fonction PrP^C dans les processus inflammatoires associés à la mucoviscidose, nous avons développé une nouvelle lignée cellulaire invalidée pour la protéine PrP^C, en utilisant la stratégie CRISPR / Cas9.

Dans l'ensemble, notre projet a avancé nos connaissances sur la compréhension de l'implication de la protéine CFTR dans l'inflammation et le stress oxydatif associé aux cellules bronchiques mucoviscidosiques. Nous avons aussi mis en évidence l'implication du cuivre dans le stress et l'inflammation dans les cellules mucoviscidosiques. Finalement, nous avons montré que dans les cellules bronchiques humaine, la protéine PrP^C est exprimée et localisée dans les jonctions cellulaires où elle participe à la protection contre le stress d'origine cuprique.