

Impact de la modulation de TRPM7 et ATF6 sur le cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Florentin Huguet

► To cite this version:

Florentin Huguet. Impact de la modulation de TRPM7 et ATF6 sur le cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. NNT: 2017BRES0058. tel-01820614

HAL Id: tel-01820614 https://theses.hal.science/tel-01820614

Submitted on 22 Jun 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.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE



universite de bretagne occidentale

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE Mention : Biologie-Santé École Doctorale SICMA

présentée par

Florentin Huguet

Préparée à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale, UMR 1078,

Impact de la modulation de
TRPM7 et d'ATF6 sur le
cystic fibrosisFabienn
ProfesseOlivier T
Docteur,
Docteur,

transmembrane conductance regulator.

Thèse soutenue le 29 Juin 2017 devant le jury composé de :

Fabienne FOUFELLE Professeur, Paris VI - UMRS 1138 / Rapporteur

Olivier TABARY Docteur, Paris VI – UMRS 938 / Rapporteur

Nicolas PALLET Docteur, Paris V - UMRS 1147 / Examinateur

Marc BLONDEL Professeur, UBO – Inserm UMR 1078 / Examinateur

Claude FEREC Professeur, UBO – Inserm UMR 1078 / Examinateur

Pascal TROUVE Docteur, Inserm UMR 1078 / Directeur de thèse

Mathieu KERBIRIOU Docteur, UBO – Inserm UMR 1078 / Co-encadrant de thèse Cette thèse a été effectuée sous la direction du Docteur Pascal Trouvé et co-encadrée par le Docteur Mathieu Kerbiriou, au sein de l'UMR 1078 à Brest. Ce projet a pu être réalisé grâce au soutien financier de l'Inserm, de la Région Bretagne, et des associations Gaëtan Saleün et Vaincre la Mucoviscidose.





Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury d'avoir consacrer le temps nécessaire à l'évaluation de ce travail. Je remercie le Dr. Fabienne Foufelle et le Dr. Olivier Tabary d'avoir pris le temps d'examiner ce manuscrit. Je remercie également le Dr. Nicolas Pallet, le Pr. Marc Blondel et le Pr. Claude Férec d'avoir accepté d'être examinateur de cette soutenance de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Claude Férec une seconde fois pour m'avoir donné la chance d'effectuer cette thèse dans son laboratoire. J'en profite pour souhaiter un excellent mandat au Dr. Emmanuelle Génin, succédant au Pr. Férec au poste de directrice de l'unité.

Je tiens également à remercier l'association Gaëtan Saleün et son président René Vigouroux pour les six mois supplémentaires. Je remercie également Marie-Aude, qui par son travail permet également à cette association d'être impliquée plus que jamais dans la lutte contre la mucoviscidose.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse le Dr. Pascal Trouvé sans qui rien de tout ceci n'aurait été possible. Merci de m'avoir offert l'immense opportunité d'intégrer ton groupe en tant que thésard. Merci pour tous ces conseils (plus ou moins précieux) que tu as su me donner aux moments opportuns, de m'avoir fait découvrir la science sous un autre angle, beaucoup moins conventionnel. Merci de m'avoir aiguillé dans les moments de flottements. J'espère vraiment que tous les projets scientifiques que tu as en tête se concrétiseront mais je n'ai pas trop de doute là-dessus. Merci également de m'avoir fait confiance de m'avoir donné la chance de réaliser six mois supplémentaires, bien utiles à la concrétisation de cette thèse. J'espère aussi qu'à l'avenir toi et tes étudiants n'auront plus de problème avec le service de sécurité de la fac. Pour finir j'ai été ravi de partager avec toi tous ces moments café/clope (ratio 1 : 18) à parler de tout sauf de science (si un peu quand même).

Je remercie également très chaleureusement mon co-encadrant de thèse le Dr. Mathieu Kerbiriou. Une fois n'est pas coutume je te remercie pour toutes ces nouvelles choses que tu as mis dans ma besace durant ces quatre années. Je te remercie tout d'abord d'avoir accepté ma candidature en stage de Master 2. En second lieu je te remercie surtout pour le temps que tu as pu consacrer à ce projet malgré ton emploi du temps de cours surchargé. Je te remercie également pour la première correction de cette thèse. Merci d'avoir pris le temps de corriger les très nombreuses fautes d'orthographe et étourderies ainsi que tout le reste en parallèle de l'énorme paquet de copie que tu as à corriger.

Je remercie chaleureusement mes deux collègues de bureau : HaineB et MLC. Il faut bien avouer que vous n^2 êtes pas très faciles à vivre tous les jours. Merci pour tous les conseils que vous avez pu

m'apporter au cours de ces quatre années de vie commune, ainsi que les bons moments partagés. Merci de m'avoir supporté durant ces quatre années et par-dessus tout merci d'avoir su ancrer en moi la passion du nettoyage de labo...Je te souhaite bonne continuation sous les tropiques ML en espérant que ton projet se concrétise ! Quant à toi Benz(N) j'espère que la nouvelle organisation du laboratoire ne va pas trop bouleverser ton quotidien et que tu vas pouvoir continuer de diriger le labo d'une main de fer. Et bon courage avec les petits nouveaux.

Je remercie également BB et DD, deux amis formidables. Merci pour votre bonne humeur et ces excellents moments passés ensemble. On vous attend à Paname !! Faudrait que vous appeliez votre gosse genre Cédric ça ferait la suite BB, CC et DD ! Bisous et merci à vous les ptis culs !!

Je remercie Paul et je te souhaite bonne chance pour ta thèse. Je remercie également ses deux coéquipiers : Marjo et Régie !! Marjocotton bon courage pour la fin de thèse et la suite, et continue de garder ton sens critique aussi affuté qu'il l'est. Régie, bientôt un an que tu as fini et que tu me fournis en conseil plus qu'utile à une fin de thèse. Merci pour toutes ces conversations relativement inutiles de fin de soirée, et j'espère que tes futures recherches seront fructueuses. J'en profite pour remercier l'ensemble de feue l'équipe CSC, Olivier, Christophe et les trois stagiaires : Néné, Anne Banet et Nadja.

Pupu et Flo, merci à vous de m'avoir fait découvrir Brest ainsi qu'une portion de ses habitants avec qui j'ai passé de très bons moments. Quant à vous deux, on va bientôt se revoir ça ne fait aucun doute, continuant de se faire des soirées de vieux maintenant que vous êtes trois. Plus sérieusement, merci sincèrement à vous deux pour tous ces bons moments passés ensemble, en espérant que cela continue.

Je tiens à dire merci à Mohamed : « Merci à Mohamed !! » (Grosse blague, vla le veauni huya !!). Bref, s'il y a bien une personne que l'on doit tous féliciter ici c'est bien toi, parce que pour nous avoir supporter pendant quatre ans en soirée sans jamais avoir quécra, fallait se lever de bonheur (assez paradoxal puisque ce n'est pas ton cas) !! A titre plus personnel, merci d'avoir tenté de m'apprendre ce qu'est un rythme musical et surtout merci pour toutes ces discussions de fin de soirée plus que fructueuses (la plupart du temps) ! Je te souhaite bonne chance pour ta fin de thèse mais bon tkt barquette !! Non mais promis c'était la dernière fois que j'essayais de parler comme toi, je vois bien que ça le fait pas aussi bien.

Si je n'avais pas su que tu faisais une thèse, je pense que je t'aurais facilement imaginé fromager ma Kikinette. Merci pour ton enthousiasme, ton humour (quand tu n'es pas malade ni fatigué) et merci pour les bons moments passés entre Brest et Donges et à Brest-même. Bon courage avec tous tes projets dans le bâtiment !! Je remercie le reste des membres du laboratoire de neuro que j'ai eu le plaisir de rencontrer, Katell, Christelle, Olivier et leurs collègues. Je tiens à remercier Jérôme, Christelle et Maxime du 54 Café pour leur soutien « moral(coolisé) » durant ces deux dernières années de thèse. Merci pour les parties de fléchettes, les pintes, les vodkas, les shots, et autres stimulants qui nous ont détendu et permis de tenir le coup dans les moments sombres.

Même si ce grand Monsieur ne lira probablement jamais ça je remercie le Pr. Pierre « Piotr » Lehn tout d'abord pour ces petits cours improvisés mais néanmoins très instructifs de biologie moléculaire, pour toutes ces fabuleuses histoires narrées au repas de midi à la cafète. Merci également pour les blagues (plus que douteuses) racontées au pas d'une porte, et surtout merci d'avoir su rester humble malgré vos nombreux talents.

Je remercie particulièrement Catherine et Laurent Corcos de l'équipe ECLA. Merci pour leurs nombreux conseils concernant cette m**** de culture cellulaire. Merci pour tout le matos prêté, la centri et surtout les divers conseils en matière de proto. Bon courage pour la suite et qu'ECLA perdure !! Je remercie aussi les deux dames de cette équipe : Lieutenant Dan et Brigitte.

Je remercie l'équipe des levures (YL) pour les bons moments passés ensemble ainsi que les nombreux échanges que l'on a pu avoir. Faudrait penser à embaucher des mecs ceci dit, on se sentirait moins seul. Merci à Marc, Cécile, Gaëlle, petit Olo, Flavy, Nadège, Hélène, Alice, Rustine, etc.

Je remercie les membres de la thérapie génique : Tristan, Yannou, Tony et Angélique.

Je remercie Sophie et Mimi pour les nombreux services rendus, je pense que cette unité vous doit beaucoup et moi également. Dans le même esprit, je remercie également Michelle Kerleroux pour toutes les aides de dernière minute, merci de n'avoir jamais raccroché le téléphone et merci d'avoir évité que la fin de thèse ne devienne un cauchemar administratif. Je remercie au passage l'école doctorale SICMA, pour l'organisation et les moyens mis en œuvre dans les diverses formations proposées et le bien-être de ses étudiants. Je remercie toutes ces personnes tapies dans l'ombre administrative (Valérie, Rozenn) de faire tourner la boutique et venir en aide aux étudiants.

Je remercie toutes les personnes que j'ai pu côtoyer de près ou de loin durant ces quatre années : Sophie, Chan (Clonus), Manu du séquençage, Laura, Adeline, M. Boule, Patrick, Didier du ménage, la dame de la sécurité, Réné des dentaires, Fred de physio, les sages-femmes Francine et Béa, Anthony du bad (et de la repro), les stagiaires (Marlène, Marion, Benoît, Emile, Elise et tous ceux que j'ai oublié) d'une aide si précieuse, ainsi que tous les membres de l'UMR-1078.

Peut-être que tu es toujours en train de chercher la suite des remerciements que j'ai écrit pour toi ou tu es simplement dèg pour la pauvre phrase que j'ai écrite et tu t'es cassé (je te connais) !! Toujours est-il

que la suite est là et je te remercie tout d'abord d'avoir apporté au laboratoire (en même temps que ton gros cul) ta bonne humeur, ta générosité, ton altruisme, ta philanthropie, ta magnanimité (si tu ne sais pas ce que ça veut dire tu cherches !!). Il est certitude qu'un jour nos chemins se sépareront, le plus tard possible je l'espère...

Je voudrais remercier le Dr. Maria-José Lista pour avoir rendu cette dernière année de thèse aussi belle et mouvementée qu'elle le fut. Merci déjà pour tous tes conseils en matière de technique de laboratoire. Merci pour l'ouverture d'un marché noir spécialisé dans la vente de réactifs de labo entre nos différentes équipes. Au-delà de ça et d'un point de vue plus personnelle je tiens à te remercier de rendre tous ces petits moments qu'on passe ensemble aussi simples et merveilleux soient-ils, de me faire rire tous les jours, d'être aussi attentionnée et surtout de pas être une vraie fille chiante. Ton soutient, tes envies permanentes de faire la fête et de danser, ta bonne humeur, tes blagues nulles, ta manière de parler le français, ton impulsivité, ton intelligence, tes habitudes, tes goûts font qu'aujourd'hui tu es ma *gordita*. TAMYPSMGDA/TEMPS

Je tiens également à remercier mes deux sœurs, Sœur 1 (Mathilde) et Sœur 2 (Amandine), sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour...ah non en fait je serai quand même là sans vous !! Plus sérieusement merci à toutes les deux pour tout le reste.

Pour finir je tiens à remercier infiniment et le plus sincèrement du monde Père et Mère de m'avoir permis d'être ici aujourd'hui, c'est entièrement grâce à vous alors un grand MERCI pour tout ça !! Un jour promis quand je serai devenu un adulte responsable je vous rendrai la pareille.

Table des matières

| Reme | rcieme | nts | ii | |
|---------------------------------------|----------|--|-----|--|
| Table | des ma | atières | i | |
| Liste o | des abr | éviations | iii | |
| Table | des illu | istrations | v | |
| INTRC | DUCTI | ON | 0 | |
| I. L | e réticu | ulum endoplasmique | 1 | |
| a. | Géné | ralités | 1 | |
| b. | Rôles | du réticulum endoplasmique granuleux | 2 | |
| | a) | Biosynthèse protéique | 2 | |
| | b) | Repliement des protéines | 8 | |
| | c) | Protéines chaperonnes et contrôle qualité | 8 | |
| | d) | Le système ERAD | 12 | |
| II. L | .'Unfold | ded Protein Response | 17 | |
| a. | Géné | ralités | 17 | |
| | a) | Découverte | 17 | |
| | b) | Inducteurs de l'UPR | 18 | |
| b. | Rôle (| général de l'UPR | 19 | |
| c. Les différents effecteurs de l'UPR | | | 20 | |
| | a) | BiP | 20 | |
| | b) | IRE1 | 25 | |
| | c) | PERK | 27 | |
| | d) | ATF6 | 29 | |
| | e) | Induction de l'apoptose par l'UPR | 31 | |
| d. | Patho | Pathologies impliquant le stress du RE et l'UPR et traitements possibles | | |
| | a) | Exemple de l'implication de BiP dans certains cancers | 33 | |
| | b) | Exemple de la voie IRE1 dans le diabète de type 2 | 33 | |
| | c) | Exemple de PERK dans la maladie d'Alzheimer | 34 | |
| | d) | Exemple d'ATF6 dans l'ischémie-reperfusion | 35 | |
| III. | La mu | ucoviscidose | 38 | |
| a. | Géné | ralités | | |
| | a) | La mucoviscidose à travers le temps | | |
| | b) | et à travers le monde | 39 | |
| b. | Le gè | ne <i>cftr</i> et la protéine CFTR | 42 | |
| | a) | Structure et fonctionnement de la protéine CFTR | 42 | |
| | b) | Biogénèse et contrôle qualité du CFTR | 45 | |

| | c) | Principales fonctions du CFTR49 | | | | |
|----------------------------|---|--|--|--|--|--|
| с. | Le CF | CFTR F508del | | | | |
| | a) | Généralités51 | | | | |
| | b) | CFTR-F508del et UPR53 | | | | |
| d. | Les at | tteintes54 | | | | |
| | a) | Respiratoires | | | | |
| | b) | Digestives | | | | |
| | c) | Génitales | | | | |
| e. | Thérapies protéiques du CFTR5 | | | | | |
| | a) | Correcteurs | | | | |
| | b) | Potentiateurs | | | | |
| | c) | Stabilisateurs60 | | | | |
| | d) | Associations de classes de médicaments61 | | | | |
| PROBLEMATIQUES DE LA THESE | | | | | | |
| RESUL | TATS | 65 | | | | |
| I. P | Partie 1 : ATF6 dans la mucoviscidose66 | | | | | |
| II. P | artie 2 | : Le magnésium dans la mucoviscidose110 | | | | |
| DISCU | DISCUSSION | | | | | |
| III. | Résul | tats et discussion136 | | | | |
| IV. | Conclusion - Perspectives | | | | | |
| BIBLIOGRAPHIE | | | | | | |
| ANNEXES | | | | | | |

Liste des abréviations

| 4-PBA | sodium phénylbutyrate |
|-------------------|--|
| AA | Acide aminé |
| ABC | ATP-Binding Cassette |
| AEBSF | fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyle |
| AHA1 | Activator of HSP90 ATPase homologue |
| ATF | Activating Transcription Factor |
| AMP | Adénosine Monophosphate |
| ATP | Adénosine Triphosphate |
| BiP/GRP78 | Binding immunoglobulin Protein/Glucose-Related Protein 78kDa |
| CF | Cystic Fibrosis |
| CFBE | Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial |
| CFTR | Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator |
| CHIP | C-terminus of Hsc70-Interacting Protein |
| СНОР | CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein |
| COPII | Coatomer Protein II |
| CNX | Calnéxine |
| CREB | Cyclic-AMP-Responsive-Element-Binding protein |
| CRT | Calréticuline |
| EDEM | ER Degradation Enhancing & Mannosidase like protein |
| eIF2 | eucaryotic translation Initiation Factor-2 |
| EN ₂ C | Enithelium Na ⁺ Channel |
| ENaC | Endonlasmia Patiaulum |
| | Endoplashine Reliculum |
| | ER-Associated Degradation |
| ERCIC | ER-resident DNAJ protein |
| ENGIC | En/Golgi interineutate Compartiment |
| ERU | Espèce Reactive de l'Oxygene |
| EKSE | EK-stress Response Element |
| FKBP8 | FK506 Binding Protein 8 |
| GIC | |
| GICNAC | 2 N-acetylglucosamines |
| GRP94 | Glucose-Related Protein 94kDa |
| GIP | Guanosine Tripnosphate |
| Haj | Human Dhaj homolog |
| HRD | HMG-CoA reductase degradation |
| HSC | Heat Shock Cognate |
| HSP | Heat Shock Proteins |
| IKEI | Inositol-Requiring Enzyme |
| JNK | c-Jun N-terminal Kinase |
| Man | Mannose |
| MSD | Membrane Spanning Domain |
| NBD | Nucleotide Binding Domain |
| NEF | Nucleotide-Exchange Factor |
| 089 | Osteosarcoma 9 |
| PERK | PKR-like ER Kinase |
| PGES 3 | Prostaglandin E Synthase 3 |
| РКА | Protein Kinase A |
| РКС | Protein Kinase C |
| PKR | Protein Kinase RNA |
| PDI | Protein Disulfide-Isomerase |
| RE | Réticulum Endoplasmique |
| S1P | Site-1-Protease |

| Site-2-Protease |
|--|
| Séquence d'Arrêt de Transfert |
| Substrate Binding Domain |
| Sterol Regulatory Element Binding Protein |
| Signal Recognition Particle |
| Transmembranaire |
| Transmembrane Domain |
| Tumour Necrosis Factor Receptor |
| TNFR-Associated Factor-2 |
| Transient Receptor Potential cation channel, subfamily M, member 7 |
| Ubiquitine C |
| UDP-Glucose : Glycoprotein glucosyltransferase 1 |
| upstream Open Reading Frame |
| Unfolded Protein Response |
| X-box Binding Protein 1 |
| XTP3 transactivated protein |
| |

Table des illustrations

| Figure 1 : Schéma expliquant brièvement la technique de pulse-chase utilisée par Palade |
|---|
| Figure 2 : Schéma explicatif de la translocation co-traductionnelle |
| Figure 3 : Modèle d'insertion d'une protéine de type I dans la membrane du RE |
| Figure 4 : a) Modèle d'insertion d'une protéine de type II dans la membrane du RE6 |
| Figure 5 : Modèle d'insertion d'une protéine à multiples domaines TM dans la membrane du RE7 |
| Figure 6 : Schéma récapitulatif des différentes catégories de chaperonne présentes dans le RE10 |
| Figure 7 : Schéma de la cupule glucidique11 |
| Figure 8 : Modèle de la voie de dégradation des protéines glycosylées mal repliées14 |
| Figure 9 : Comparaison des complexes de rétro-translocation15 |
| Figure 10 : Shéma représentatif des différents inducteurs du stress du RE19 |
| Figure 11 : Schéma récapitulatif du rôle général de l'UPR20 |
| Figure 12 : Schémas représentatifs de la structure de BiP21 |
| Figure 13 : Schéma récapitulant les différentes localisations de BiP |
| Figure 14 : Schéma général de l'UPR25 |
| Figure 15 : Schéma descriptif de la voie IRE1 de l'UPR26 |
| Figure 16 : Schéma descriptif de la voie PERK de l'UPR28 |
| Figure 17 : Schéma montrant l'homologie des voies d'activation des protéines ATF6 et SREBP30 |
| Figure 18 : Schéma récapitulatif des différentes voies de signalisation induites par l'UPR32 |
| Figure 19 : Shéma simplifié de la structure de TRPM736 |
| Figure 20 : Graphique représentatif des différences d'incidence de la mucoviscidose |
| Figure 21 : Prévalence de la mucoviscidose en France40 |
| Figure 22 : Tableau présentant les mutations de la mucoviscidose les plus fréquentes dans la |
| population française en 201541 |
| Figure 23 : Schéma représentatif de la structure du CFTR42 |
| Figure 24 : Modèle théorique de la structure du CFTR-WT43 |
| Figure 25 : Schéma du modèle d'ouverture et de fermeture du canal CFTR44 |
| Figure 26 : Schéma simplifié de la biosynthèse du CFTR45 |
| Figure 27 : Schéma de l'insertion des deux premiers TMs du CFTR dans la membrane du RE46 |
| Figure 28 : Schéma des différentes étapes de l'insertion du CFTR dans la membrane du RE47 |
| Figure 29 : Réseau des protéines chaperons impliquées dans le contrôle et le repliement du CFTR48 |
| Figure 30 : Schéma simplifié de la régulation du volume d'eau du mucus |
| Figure 31 : Exemples de canaux ioniques ou de transports transmembranaires régulés par le CFTR51 |
| Figure 32 : Image de microscopie confocale sur des macrophages humains représentant le CFTR52 |

| Figure 33 : Schématisation des conséquences d'une dysfonction de la protéine CFTR | 55 |
|---|-------|
| Figure 34 : Diagramme représentant l'impact de l'altération de la fonction du CFTR | 56 |
| Figure 35 : Schéma récapitulatif des six classes de mutation | 59 |
| Figure 36 : Tableau récapitulatif des principales molécules correctrices ou potentiatrices du C | FTR61 |

INTRODUCTION

Les protéines ont longtemps été imaginées et visualisées comme une simple succession d'acides aminés (AA) disposés sur un plan linéaire. En 1864, Felix Hoppe-Seyler cristallise l'hémoglobine pour la première fois et émet l'hypothèse que les protéines possèdent en réalité des structures bien plus complexes que ce que les scientifiques de l'époque pouvaient penser. Près d'un siècle plus tard, en 1962, Kendrew et Perutz reçoivent le prix Nobel de chimie pour avoir observé et décrit la structure de la myoglobine de mouton par cristallographie aux rayons X [1]. Ils ont pu observer pour la première fois que les protéines n'étaient pas planes mais qu'elles étaient repliées dans l'espace. Ce repliement est appelé conformation tridimensionnelle 3D, ou structure tertiaire. La conformation 3D d'une protéine n'est pas le fruit du hasard mais est d'une part, intrinsèquement liée à la séquence d'AAs composant la protéine [2] et d'autre part, dépendante de l'environnement dans lequel la protéine évolue [3]. En outre, le repliement 3D d'une protéine est un élément primordial et indissociable de sa fonction [4]. Afin d'éviter la survenue d'erreurs dans le repliement des protéines, la cellule a mis en place des systèmes de contrôle et de correction de la conformation 3D des protéines, cruciaux pour la survie cellulaire. Une conformation 3D alternative peut en effet modifier la fonction d'une protéine et de ce fait, peut être à l'origine de certaines pathologies (protéinopathies) telles que les maladies à prion, la maladie d'Alzheimer, la chorée de Huntington ou la maladie de Parkinson [5-9]. L'organite cellulaire au cœur de ce contexte est le réticulum endoplasmique (RE).

I. Le réticulum endoplasmique

a. Généralités

L'histoire du RE débute en 1944 avec Keith Porter. En effet, cette année-là, celui que l'on surnommait le « Père de la biologie cellulaire » se marie avec la microscopie électronique et collabore notamment avec Albert Claude, expert en fractionnement cellulaire par ultracentrifugation, afin d'observer, pour la première fois de l'histoire, des cellules en microscopie électronique en transmission. De ce ménage à trois naîtront des photographies de cellules grossies et résolues à des niveaux jamais atteints auparavant [10]. Outre le fait d'apporter une multitude de nouvelles informations sur les organites déjà décrits (mitochondries, noyaux, etc.), cette prouesse technologique majeure permet la découverte d'un nouveau composant cytoplasmique. En effet, en observant au microscope électronique des cellules embryonnaires de poulet, ils décrivent « une substance » peu dense délimitée par une membrane dense dentelée à l'aspect granuleux sur sa face externe [11]. Après de multiples

collaborations et observations du nouvel organite, notamment dans des cellules cancéreuses [12-15], Porter décide de nommer ce nouveau composant cellulaire « réticulum endoplasmique ».

Le RE est aujourd'hui décrit comme un organite cellulaire, exclusivement eucaryote, constitué de réseaux de tubules membranaires interconnectés. Il existe deux types de RE, différant par leurs structures et leurs fonctions, et présents dans la quasi-totalité des cellules eucaryotes : un RE lisse et un RE granuleux. Ces deux RE se différencient respectivement par l'absence ou la présence de ribosomes à leur surface. Le RE est la prolongation de la double membrane nucléaire [16].

Sans vouloir en aucun cas dénigrer l'importance des fonctions du RE lisse (détoxification, stockage du calcium, synthèse de lipides [17]), nous ne nous intéresserons dans ce manuscrit qu'au RE granuleux.

Au cours de ces travaux, Porter observe que le RE libère dans le cytosol des sortes de « granules ». Porter est alors loin d'imaginer qu'il vient d'effleurer la fonction majeure du RE: la biosynthèse des protéines.

b. Rôles du réticulum endoplasmique granuleux

a) Biosynthèse protéique

Bien qu'il n'ait pas travaillé seul, c'est Georges Palade qui fournit une première preuve du rôle du RE dans la synthèse des protéines, ce qui lui vaudra le prix Nobel de Médecine en 1974, (Albert Claude et Christian De Duve étant colauréats). Palade démontre ceci en réalisant des expériences de *pulse-chase*, couplées à de l'autoradiographie (leucine tritiée), sur des cellules exocrines de pancréas de cochon d'Inde [18] (Figure 1). Il observe que les leucines radioactives, intégrées dans les protéines néo-synthétisées, sont présentes dans le RE, migrent vers l'appareil de Golgi, puis sont transportées à la membrane via des vésicules afin d'être exocytées [19].



THE CELL, Fourth Edition, Figure 10.2 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Figure 1 : Schéma expliquant brièvement la technique de pulse-chase utilisée par Palade afin de démontrer le rôle du RE dans la biosynthèse des protéines. On y voit, à 3 minutes, la leucine tritiée présente dans les RE. A 7 minute, la leucine tritiée a transité vers l'appareil de Golgi où elle sera transportée dans des vésicules puis exocitée à 120 minute à travers la membrane plasmique. (THE CELL, Fourth Edition)

Grâce aux travaux accomplis ces dernières années on sait aujourd'hui qu'un tiers des protéines néo-synthétisées transitent par le RE [20, 21]. Ce sont majoritairement les protéines membranaires, sécrétées et lysosomales. Brièvement, une fois la transcription et la maturation de l'ARNm effectuées, débute alors la traduction par un ribosome libre dans le cytosol de la cellule. Si le polypeptide codé par l'ARNm doit passer par le RE alors le début de sa séquence d'AA contiendra une séquence située en N-terminal appelée peptide signal. Cette séquence va permettre la liaison du ribosome à la membrane du RE. En effet, un complexe protéique appelée particule de reconnaissance du signal (en anglais *signal recognition particle* (SRP)) se fixe au peptide signal et au ribosome afin de les transporter vers la membrane du RE (Step 1 Figure 2). La SRP se fixe sur son récepteur situé sur la membrane externe du RE, le ribosome se fixe sur un complexe protéique et le signal peptide de la protéine est inséré et fixé dans le pore de translocation appelé Sec61 (Step 2 Figure 2). La protéine peut alors être synthétisée et transloquée dans la lumière du RE au fur et à mesure, c'est ce que l'on appelle la translocation

co-traductionnelle (par opposition à la translocation post-traductionnelle où la protéine est transloquée dans la lumière du RE une fois la traduction dans le cytosol terminée) (Step 3 Figure 2). Une *signal peptidase* coupe ensuite la partie correspondante au signal peptide et la synthèse protéique se poursuit jusqu'à ce que la totalité de la protéine soit dans le RE (Step 4 Figure 2) [22].





Figure 2 : Schéma explicatif de la translocation co-traductionnelle. L'ARNm en cours de traduction par un ribosome libre dans le cytosol est transporté à la membrane du RE grâce à la SRP qui permet la liaison entre le ribosome et le peptide signal. La SRP se fixe à son récepteur situé sur l'extérieur de la membrane du RE puis le peptide signal est inséré dans le pore Sec61, la traduction et la translocation de la protéine se font simultanément. Une signal peptidase située dans la lumière du RE coupe ensuite le peptide signal puis, une fois la traduction de la protéine terminée, cette dernière se replie spontanément. (THE CELL, Fourth Edition)

Le paragraphe ci-dessus donne une brève explication de la translocation co-traductionnelle seulement pour les protéines sécrétées, golgiennes, lysosomales ou du RE. La translocation des protéines transmembranaires (et quelques autres protéines solubles) va nécessiter une étape supplémentaire : l'insertion co-traductionnelle dans la membrane du RE. En effet, les propriétés hydrophobes des domaines transmembranaires impliquent que ces protéines ne doivent pas se retrouver dans un environnement aqueux tel que celui du RE. En outre, il faut savoir que le

mode d'insertion de la protéine dans la membrane du RE dépend de la topologie de la protéine et de la localisation finale des extrémités N-terminale et C-terminale [23].

Le premier cas est celui des protéines possédant une extrémité N-terminale externe et l'extrémité C-terminale cytosolique (protéine de type I). Le pore de translocation est le même que pour les protéines qui ne sont pas insérées dans la membrane du RE, le canal Sec61 [24]. L'initiation de la translocation est également identique, à la seule différence que ces protéines contiennent une séquence d'arrêt de transfert (SAT) qui, comme son nom l'indique, stoppe la translocation. Bien que la translocation soit stoppée, le ribosome à l'extérieur du RE continue la traduction de l'extrémité C-terminale cytosolique. L'intégration dans la membrane du RE se réalise grâce au déplacement latéral de la SAT à travers les sous-unités de Sec61 [25]. La SAT, qui est hydrophobe et α -hélicoïdale, sert de point d'ancrage de la protéine dans la membrane du RE (Figure 3).



Figure 3 : Modèle d'insertion d'une protéine de type I dans la membrane du RE. La protéine (ici l'insuline) est transloquée cotraductionnellement à travers Sec61. La translocation s'arrête lorsqu'une SAT est traduite, cependant la traduction continue dans le cysol. Cette SAT, une fois intégrée dans la membrane du RE, sert de point d'ancrage à l'insuline dans la membrane du RE. (Molecular Cell Biology, 8th edition)

Les protéines de type II sont des protéines dont l'extrémité N-terminale est cytosolique et l'extrémité C-terminale externe. Ici aussi, le mode de translocation est quasiment similaire aux protéines non insérées dans la membrane du RE, à deux différences près. La première différence réside dans le fait qu'il n'y a pas de peptide signal à l'extrémité N-terminale de la protéine, c'est un domaine interne de la protéine. Ainsi, lorsque cette séquence est reconnue par la SRP, la partie N-terminale de la protéine est déjà traduite. Le peptide signal est orienté de manière a

ce que la partie N-terminale déjà traduite ne soit pas transloquée dans la lumière du RE. Puis, ce peptide signal est fixé à l'intérieur du translocon et le reste de la protéine est transloquée dans la lumière du RE au fur et à mesure de sa traduction. La partie C-terminale se retrouve ainsi dans la lumière du RE. La seconde différence réside dans le fait que, contrairement aux protéines non insérées et aux protéines de type I, le peptide signal ne va pas être clivé mais au contraire devient une hélice α et sert de point d'ancrage à la protéine dans la membrane (Figure 4).

Il existe également les protéines membranaires de type III. L'insertion co-traductionnelle est la même que celle des protéines du type II mais l'orientation de la protéine dans la membrane du RE est opposée. Pour cela, le peptide signal est orienté de manière à insérer la partie N-terminale dans la lumière du RE. Enfin, le ribosome termine la traduction de l'extrémité C-terminale de la protéine dans le cytosol.



Figure 4 : a) Modèle d'insertion d'une protéine de type II dans la membrane du RE. La partie N-terminale de la protéine (ici une asialoglycoprotéine) ne contient pas de peptide signal et est traduite dans le cytosol. Lorsque le peptide signal interne est traduit il est reconnu par la SRP. Le peptide signal, orienté de manière à ce que l'extrémité N-terminale de soit pas transloquée, est alors fixé dans Sec61. Le reste de la protéine est transloquée co-traductionnellement dans la lumière du RE. Le peptide signal n'est pas clivé et s'enroule en hélice α afin de servir de point d'ancrage de la protéine dans la membrane du RE. b) Modèle d'insertion d'une protéine de type III dans la membrane du RE. Le fonctionnement est le même que pour les protéines de type II mais le peptide signal est orienté de manière à ce que l'extrémité C-terminale de la protéine soit cytosolique. (Molecular Cell Biology, 8th edition)

Le dernier cas est celui des protéines possédant plusieurs domaines transmembranaires (protéine de type IV). Cette insertion co-traductionnelle va être possible en utilisant les trois cas précédemment expliqués. Il y a d'abord traduction de l'extrémité N-terminale puis

reconnaissance du peptide signal interne. Le peptide signal, servant d'ancrage à la membrane et fixé au translocon, correspond au premier domaine transmembranaire de la protéine. L'extrémité C-terminale continue d'être traduite et transloquée jusqu'à ce qu'une SAT soit traduite. Cette SAT correspond au second domaine transmembranaire de la protéine. Il y a alors intégration dans la membrane du RE des deux domaines transmembranaires par ouverture latérale du translocon Sec61. S'en suit alors une alternance de peptide signal et de SAT dans la composition de la protéine, qui formeront les différents domaines transmembranaires de la protéine (Figure 5). Une protéine ayant les extrémités N-terminale et C-terminale dans le cytosol appartient au type IV-A. Les protéines de type IV-B ont l'extrémité N-terminale externe et l'extrémité C-terminale cytosolique.



Figure 5 : Modèle d'insertion d'une protéine à multiples domaines TM (protéine de type IV) dans la membrane du RE. L'extrémité N-terminale de la protéine (ici le transporteur de glucose GLUT1) est traduite dans le cytosol puis un premier peptide signal interne est reconnu par la SRP. La protéine est orientée de manière à ce que son extrémité N-terminale soit cytosolique. Le peptide signalest fixé à Sec61 et la protéine est transloquée dans la lumière du RE. Lorsqu'une SAT est traduite il y a arrêt de la translocaton. Le peptide signal et la SAT se déplacent latéralement afin de former les deux premiers domaines transmembranaires de la protéine, puis la translocation reprend avec un nouveau peptide signal. L'alternance de peptide signal et SAT formeront les domaines transmembranaires de la protéine. (Molecular Cell Biology, 4th edition)

La prochaine étape de maturation des protéines s'effectue dans la lumière du RE. Cet environnement, présentant une très forte concentration en protéines (de l'ordre de 100 à 400 mg/mL) [26, 27], est oxydant et optimisé notamment pour le repliement et l'assemblage des protéines [28].

b) Repliement des protéines

Tout d'abord, il est nécessaire de préciser que ce paragraphe n'a pas pour but de décrire les différents phénomènes de repliement protéique, ces derniers étant nombreux, complexes (pas encore totalement compris) et régis par des lois appartenant aux domaines de la physique et de la thermodynamique. Brièvement, lors de son entrée dans la lumière du RE, la protéine est sous une forme non repliée, instable, et ne possède pas de structure tertiaire. C'est dans la lumière du RE que la protéine va pouvoir se replier (forme native, stable) de manière correcte afin de devenir une unité fonctionnelle au sein de la cellule [26, 29]. Le repliement des protéines est un processus nécessitant précision mais également rapidité (le repliement des protéines s'effectue en moyenne en quelques microsecondes [30]). En effet, comme dit précédemment, la conformation de la protéine est la composante majeure de sa fonction et aucune erreur de conformation ne doit être commise. Le repliement doit être rapide dans le sens où sous leur forme non repliée, les chaînes polypeptidiques externalisent des résidus hydrophobes, favorisant l'agrégation des protéines entre elles et empêchant ainsi leur repliement.

Dans un environnement donné, la protéine va se replier spontanément. L'élément clé de ce repliement est la succession d'AAs composant la protéine [2]. Les différentes propriétés physico-chimiques de chaque AA (charge, hydrophobicité, volume, etc.) vont en effet générer une structure tertiaire de la protéine de manière spontanée dans un environnement précis. Pour certaines protéines (généralement les plus petites) ce repliement spontané permet à la protéine d'être totalement fonctionnelle. En revanche, pour d'autres, ce repliement ne permet pas la fonctionnalité de la protéine, il y a alors intervention de protéines chaperonnes, permettant la finalisation du repliement. Les chaperons moléculaires vont également prendre en charge les protéines dénaturées.

c) Protéines chaperonnes et contrôle qualité

Le terme « chaperon » utilisé pour désigner la fonction de ces protéines n'est en rien une référence au célèbre conte de Charles Perrault mais, de manière tout aussi séduisante, il prend en réalité ses racines dans la pièce de cuir utilisée en fauconnerie et que l'on fait porter aux rapaces afin de couvrir leurs yeux pour qu'ils restent calmes. Ce terme a par la suite désigné la personne qui était autrefois chargée de surveiller un jeune couple non marié dans ses déplacements afin qu'il n'y ait pas de « dérives ». Et c'est bien là le rôle d'une protéine chaperonne : surveiller et éviter l'apparition de défauts éventuels pouvant survenir dans le fonctionnement ou la structure des protéines cellulaires. Ce terme fut inventé par Laskey *et al.* en même temps qu'ils mirent en évidence pour la première fois la fonction de chaperon moléculaire en 1978 [31], une des dernières fonctions protéiques découvertes [32]. Il existe différents types de protéines chaperonnes ayant des rôles et des structures très différentes mais elles ont toutes en commun la capacité de fixer des résidus hydrophobes d'autres protéines.

Les protéines chaperonnes sont surexprimées en cas de stress (thermique, oxydatif, chimique, etc.) pouvant modifier la structure 3D des protéines. En effet, les protéines étant très sensibles aux changements environnementaux [33], en cas de stress, elles se dénaturent facilement, perdent leur fonction et s'agrègent en raison de l'externalisation de leurs résidus hydrophobes, mettant en péril la survie cellulaire. Il y a alors production des chaperonnes qui vont participer à la solubilisation des agrégats protéiques [34-37], au maintien et à la réparation de la structure des protéines dénaturées, afin que même en situation de stress, les protéines puissent exécuter leurs fonctions. Les premières chaperonnes exprimées à la suite d'un stress ont été historiquement appelées *heat shock protein* (HSP) lorsqu'elles ont été découvertes dans des cellules de drosophile soumises par erreur à un stress thermique [38].

Lorsqu'il n'y pas de situation de stress, les chaperonnes interviennent dans l'aide au repliement des protéines nouvellement synthétisées [39], la formation des ponts disulfures, l'assemblage d'oligomères [40] ou la dégradation protéique [41]. Bien qu'il existe un nombre important de protéines chaperonnes résidentes de la lumière du RE, les plus connues sont *Binding immunoglobulin Protein/Glucose-Related Protein 78kDa* BiP/GRP78, *Glucose-Related Protein 94kDa* (GRP94), la calréticuline (CRT), la calnéxine (CNX) et la famille des *protein disulfide-isomerase* (PDI).

La première catégorie de chaperonnes sont celles qui vont intervenir dans le repliement des protéines, les plus abondantes étant BiP et GRP94. Il existe différentes situations qui peuvent nécessiter ou non la prise en charge d'une protéine par ce type de chaperonnes. Dans un premier cas, la protéine est assez courte et se replie rapidement une fois sa translocation dans la lumière du RE terminée. Soit la protéine est bien repliée, soit elle ne l'est pas. Dans cette dernière situation, il y a alors prise en charge de la protéine par une chaperonne qui va l'aider à se replier. Dans un second cas, concernant cette fois-ci les protéines plus longues, il y a prise en charge du peptide naissant avant la fin de sa translocation. En effet, tandis que la partie Cterminale n'est pas encore synthétisée, la partie N-terminale peut extérioriser des résidus hydrophobes (normalement intériorisés par le reste de la protéine). En attendant la fin de la synthèse permettant le repliement complet de la protéine (et donc l'intériorisation des résidus hydrophobes) une chaperonne peut venir se fixer aux résidus hydrophobes et les cacher afin d'éviter une agrégation possible avec d'autres protéines [42] (Figure 6.b). Les différentes chaperonnes peuvent agir seules, de concert ou former des complexes avec d'autres protéines chaperonnes [43].

Une seconde catégorie de chaperonnes ayant un rôle crucial dans le repliement des protéines sont les protéines appartenant à la famille des PDI. Ces protéines sont en effet chargées de la formation des ponts disulfures entre deux cystéines d'une protéine, nécessaires à la stabilité de la structure tertiaire, l'association des sous-unités protéiques ou bien la fonction de la protéine [44]. Les ponts disulfures ne peuvent être créés que dans le RE qui possède un environnement assez oxydant. Certains ponts sont définitifs et d'autres temporaires (servant à la formation des ponts définitifs). Très brièvement, durant la translocation du peptide dans le RE, des PDI catalysent l'oxydation de deux cystéines proches, puis plusieurs autres protéines (*ER oxireductin 1, glutathione peroxydase 7/8*) permettent l'oxydation des PDI afin qu'elles conservent leur potentiel oxydatif pour la formation des ponts disulfures suivants (Figure 6.c).



Figure 6 : Schéma récapitulatif des différentes catégories de chaperonnes présentes dans le RE. Les chaperonnes BiP et GRP94 prennent en charge le peptide naissant pour aider à son repliement, tandis que les PDI catalysent la formation de ponts disulfures. Une fois glycosylées, les protéines sont repliées par le couple CRT/CNX. Agissant de concert avec UGGT, les protéines bien repliées sont exportées vers l'appareil de Golgi tandis que celles mal repliées sont prises en charge par EDEM et dégradées par le protéasome. (D'après McCaffrey et Braakman, 2016)

Une dernière catégorie de protéines chaperons présentes dans le RE, les lectines CNX (ancrée à la membrane du RE) et CRT (soluble), interviennent quant à elles dans le repliement

des protéines glycosylées. En effet, la majorité des protéines sécrétées sont glycosylées dans lumière du RE. La N-glycosylation est une modification co/post-traductionnelle qui consiste dans un premier temps à l'ajout co-traductionnel par l'oligosaccharyltransférase d'un oligosaccharide sur une asparagine appartenant à une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X représente tous les AAs sauf la proline) présente dans le peptide naissant. Cette cupule glucidique est composée de 3 glucoses, 9 mannoses et 2 N-acetylglucosamines (Glc₃-Man₉-GlcNAc₂). Les glucoses N et M sont rapidement clivés respectivement par les glucosidases I et II [45, 46] (Figure 7).



Figure 7 : Schéma de la cupule glucidique transférée en bloc sur une asparagine d'un peptide naissant au cours de sa translocation dans la lumière du RE pendant le processus de N-glycosylation. L'oligosaccharide est composé de 2 N-acétylglucosamine (carrés bleus), 9 mannoses (ronds verts) et 3 glucoses (triangles rouges), répartis sur 3 chaînes A, B et C. (Ferris et al., 2014)

Une fois ce clivage réalisé, la CNX et la CRT vont pouvoir interagir avec la protéine glycosylée grâce à la reconnaissance de la chaîne monoglucosylée Glc₁-Man₉-GlcNAc₂ et aider la protéine à se replier. Agissant en synergie avec le couple CNX/CRT, ERp57 (une PDI) par exemple, créé des ponts disulfures sur la protéine en cours de repliement par les lectines [47]. La glucosidase II clive ensuite le dernier glucose (L) présent de la chaîne, ce qui entraîne la séparation de la CRT et CNX avec la glycoprotéine en cours de repliement. Si cette protéine

est parfaitement repliée, l'ER α 1,2-mannosidase I clive le mannose I de la chaîne B, puis la protéine est exportée vers l'appareil de Golgi via *ER/Golgi intermediate compartiment* (ERGIC) et les vésicules *coatomer protein II* (COPII) pour terminer sa maturation (Figure 6.e). Dans le cas contraire, la protéine est reconnue par *UDP-Glucose : Glycoprotein glucosyltransferase 1* (UGT1, également abrégé UGGT). La particularité de cet enzyme est de reconnaître à la fois les résidus hydrophobes (caractéristiques des protéines partiellement repliées) et la chaîne Man₉-GlcNAc₂ (c'est à dire sans le dernier glucose L). Un glucose est ajouté aux chaînes des protéines mal repliées et elles sont donc reprises en charge par la CNX et CRT afin d'augmenter les capacités de repliement des protéines (Figure 6.d). Ce cycle se répète durant un certain temps jusqu'à ce que l'ER α 1,2-mannosidase I [48] et possiblement l'*ER-degradation enhancing* α -mannosidase-like protein (EDEM) 2 [49] viennent cliver le mannose I de la chaîne B. L'oligosaccharide, à présent Man₈-GlcNAc₂, n'est reconnu ni par le couple CNX/CRT ni par l'UGT1, ce qui dirige la protéine glycosylée mal repliée vers le système *ER-associated degradation* (ERAD) afin d'être dégradée par le protéasome [50] (Figure 6.f).

d) Le système ERAD

Bien que les recherches des 20 dernières années aient permis une remarquable avancée dans la compréhension de ce système de dégradation, cela ne permet pas aujourd'hui d'appréhender complètement son fonctionnement. La littérature présente toutefois la dégradation des protéines via le système ERAD comme nécessitant trois étapes : la reconnaissance des protéines à dégrader, la rétro-translocation de ces protéines de la lumière du RE vers le cytosol et enfin la dégradation ubiquitine-dépendante par le protéasome 26S.

(1) Cas des protéines glycosylées

Concernant les protéines glycosylées, cette reconnaissance se réalise grâce au clivage de mannose spécifique composant la cupule glucidique, agissant comme une sorte de « glycocode » [50]. Par exemple, à la suite du clivage du mannose I de la chaîne B par l'ER α 1,2mannosidase I, la protéine glycosylée entre dans la voie de dégradation ERAD. Par la suite, le mannose K de la chaîne C est clivée par l'EDEM 1 [51] et l'EDEM 3 [52]. Ce dernier clivage permet l'interaction entre la protéine glycosylée et les protéines osteosarcoma 9 (OS9) et XTP3 transactivated protein (XTP3-B) [53, 54]. Ces deux protéines sont capables de se lier aux chaînes glucidiques de type Man₅₋₈-GlcNAc₂ et à Sel1L, une protéine appartenant au complexe de rétro-translocation [55]. OS9 et XTP3-B vont ainsi transporter la protéine à dégrader vers le pore de rétro-translocation par l'intermédiaire de SEL1L [56]. De la même manière que pour le repliement des protéines, les chaperons vont également agir en synergie. Ainsi, pendant le transport des protéines glycosylées vers le complexe, des chaperons tels que BiP , GRP94 [57] ou des PDI (ERdj5 par exemple) [58] vont déplier la protéine, facilitant ainsi son passage à travers le complexe de rétro-translocation. Une autre protéine présente dans ce complexe de rétro-translocation est *HMG-CoA reductase degradation* (HRD) 1, une ubiquitine ligase E3, associée à Derlin-2/3 [59]. SEL1L et HRD1 interagissent ensemble et régulent le passage des protéines du RE vers le cytosol [60, 61]. Avant et pendant cette rétro-translocation, les protéines mal formées sont ubiquitinylées, ces dernières sont reconnues par le protéasome 26S dans le cytosol puis dégradées (Figure 8).



Figure 8 : Modèle de la voie de dégradation des protéines glycosylées mal repliées. Une fois les protéines transloquées et Nglycosylées, la glucosidase I et II (GI et GII) clivent les deux premiers glucoses de la cupule glucidique. La protéine est repliée par le couple CRT/CNX et de nouveau clivée par la GII (clivage du dernier glucose). Si le repliement est bon, le dernier mannose de la chaîne B est clivé par l'ERManI et la protéine est sécrétée. Dans le cas d'un mauvais repliement, la protéine rentre dans le cycle de repliement entre le couple CRT/CNX et l'UGGT (cf partie précédente). L'ERManI met fin à ce cycle et la protéine est prise en charge par les protéines EDEM puis OS-9 et XTP3-B avant d'être rétro-transloquée par le complexe HRD. Les ronds verts représentent les protéines homologues chez S. cerevisiae. (D'après Xu et Ng, 2015)

Comme dit précédemment, ce modèle actuel n'est valable que pour les protéines glycosylées (la majorité des protéines synthétisées dans le RE), mais qu'en est-il des protéines non glycosylées ?

(2) Cas des protéines non glycosylées

Les mécanismes de reconnaissance par le système ERAD des protéines non glycosylées destinées à la dégradation sont encore mal compris. La littérature rapporte cependant que deux protéines ont un rôle central dans la reconnaissance des protéines non glycosylées : BiP [63] et ERdj5 [64]. Concernant le transport des protéines non glycosylées jusqu'au complexe de rétro-translocation, deux écoles s'affrontent. Certains auteurs pensent que ces voies sont bien distinctes entre les protéines glycosylées et non glycosylées [65]. Le complexe de translocation serait également différent, faisant ainsi intervenir HERP et Derlin-1 à la place de SEL1L et

Derlin-2/3 (Figure 9) [64]. Dans ce cas, ce serait principalement BiP et ERdj5 qui seraient en charge du transport et de l'interaction des protéines avec le complexe [66].

D'autres auteurs pensent en revanche que des protéines telles que EDEM1 pourraient également prendre en charge des protéines non glycosylées et les faire interagir avec le complexe HRD1/SEL1L, similairement aux protéines glycosylées [67].



Figure 9 : Comparaison des complexes de rétro-translocation pour les protéines glycosylées (à gauche) et non glycosylées (à droite). Les protéines glycosylées sont prises en charge par les protéines EDEM et le couple OS-9/XTP3-B, dépliées simultanément par BiP et ERdj5, puis rétro-transloquées par HRD1 associé à SEL1L et Derlin-2/3. Les protéines non glycosylées sont prises en charge et dépliées par BiP et ERdj5 puis rétro-transloquées par HRD1 associé à SEL1L et Derlin-2/3. Les protéines non glycosylées (à Gauche) et Derlin-1. (D'après Ushioda et Nagata, 2011)

Les auteurs en faveur d'un modèle à deux voies distinctes émettent l'hypothèse d'une possible interchangeabilité des voies. En effet, ils ont montré que sous certaines conditions de stress du RE (stress oxydatif et accumulation de protéines dans la lumière du RE) des protéines glycosylées, normalement sous contrôle des EDEMs, sont prise en charge par la voie BiP/ERdj5. Ninagawa et coll. vont plus loin en soupçonnant l'existence d'une protéine (protéine X) qui aiguillerait les protéines glycosylées vers la voie de dégradation des protéines non glycosylées [65].

En résumé, le système ERAD laisse encore plusieurs questions en suspens. Par exemple : Sec61 est-il impliqué dans la rétro-translocation des protéines ? [68]. Une autre question que nous sommes en droit de nous poser est : quel(s) élément(s) détermine(nt) l'entrée dans la voie de dégradation d'une protéine ? En effet, lorsqu'une protéine glycosylée est retenue dans le RE et alterne entre le couple CRT/CNX et l'UGT1, comment est déterminé le temps de rétention de la protéine dans le RE avant que ER α 1,2-mannosidase I dirige la protéine vers l'ERAD ? Ces questions laissent à penser que les mécanismes régissant le système ERAD sont loin d'être totalement compris.

Il est cependant bien admis que le l'ERAD est lié de très près à un autre système de protection cellulaire : l'*Unfolded Protein Response* (UPR).

II. L'Unfolded Protein Response

a. Généralités

L'UPR (ou réponse aux protéines malformées en français) peut être définie selon Mori comme une réponse adaptative induite lors d'un stress du RE et ayant pour but de maintenir/rétablir l'homéostasie du RE [69].

a) Découverte

Cette réponse aux protéines malformées a été mise en évidence en 1988 par M-J. Gething et J. Sambrook lorsqu'ils étudiaient les *glucose-related proteins* (GRP), et plus particulièrement GRP78 et GRP94 [70].

Ces deux protéines ont été découvertes dans les années 1970. A la suite d'une infection de fibroblastes d'embryons de poulets par le virus du sarcome de Rous, deux équipes ont pu observer une augmentation de l'expression de ces deux protéines [71, 72]. Ils en ont logiquement déduit que l'expression de ces deux protéines (nommées à ce moment-là 75000 daltons et 90000 daltons) était induite par le virus. En réalité, l'induction de ces protéines était due au milieu de culture dans lequel était réalisée l'infection, un milieu dépourvu de glucose. Cela fut prouvé plus tard que ce n'était pas le virus mais bien le manque de glucose qui induisait l'expression de ces deux protéines, renommées alors GRP78 et GRP95 (qui deviendra ensuite GRP94) [73]. Neuf ans plus tard, GRP78 a été identifiée comme étant la même protéine que BiP [74]. BiP avait été décrite quelques années auparavant comme une protéine liée aux chaines lourdes des anticorps des lymphocytes pré-B, d'où son appellation, *binding immunoglobulin protein* [75]. Dans ce manuscrit cette protéine sera par la suite exclusivement nommée BiP.

Pour en revenir à BiP et GRP94, il a par la suite été montré que ces deux protéines étaient inductibles par l'hypoxie, l'exposition à des pH extracellulaires bas ou par l'effet d'un traitement à la tunicamycine ou aux ionophores calciques [76]. A cette époque, la tendance était plutôt à penser que BiP et GRP94 étaient surexprimées lorsque la glycosylation des protéines du RE était altérée. Le coup de génie de Gething et Sambrook a été de prouver expérimentalement que l'induction de BiP et GRP94 n'avait pas pour origine spécialement une altération de la glycosylation mais était due à l'accumulation dans le RE de protéines mal repliées [70]. Afin de simplifier l'étude et la compréhension du nouveau mécanisme cellulaire qu'ils venaient de mettre à jour, les auteurs ont tout d'abord travaillé sur un modèle mammifère

beaucoup plus simple, celui de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), s'assurant à l'avance de la présence d'un homologue de BiP chez cet organisme [77]. C'est ainsi que l'UPR fit ses premiers pas en entrant dans le vaste domaine de la biologie cellulaire.

b) Inducteurs de l'UPR

Un peu moins de 30 ans se sont écoulés depuis la découverte de l'UPR et nous savons aujourd'hui que ce mécanisme cellulaire est crucial pour la survie de la cellule. Nous connaissons également certaines causes de l'induction de l'UPR. Parmi les inducteurs nous pouvons citer la privation de glucose, l'hypoxie (qui entraîne une déplétion en ATP), les changements de l'environnement du RE (espèces réactives de l'oxygène (ERO), une perturbation de l'homéostasie calcique et de l'état d'oxydo-réduction), une demande accrue en protéines, l'altération des systèmes de dégradation protéique, l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, certains virus, etc [78-81] (Figure 10). Toutes ces modifications entraînent un état de stress du RE nécessitant le déclenchement de l'UPR afin de lutter contre ce stress. Comme nous pouvons le constater, l'UPR est fortement liée à la notion de stress du RE bien que de récentes études tendent à montrer qu'il peut y avoir déclenchement de l'UPR ou de certains composants de l'UPR sans pour autant que le RE soit en condition de stress [82].



Figure 10 : Shéma représentatif des différents inducteurs du stress du RE conduisant au déclenchement de l'UPR. (Foufelle et Ferré, 2007)

b. Rôle général de l'UPR

L'UPR est déclenchée dans le but principal de rétablir l'homéostasie du RE. Pour cela, trois stratégies sont mises en place (Figure 11). La première consiste à inhiber la synthèse protéique afin d'empêcher l'accumulation supplémentaire de protéines mal repliées dans le RE pour ne pas aggraver la situation déjà critique. En parallèle, l'UPR active la production de protéines chaperons dans le RE afin d'augmenter les capacités de repliement protéique et de désengorger la lumière du RE. Dans le même but de désengorgement de la lumière du RE, la troisième stratégie consiste à augmenter les capacités de dégradation des protéines malformées via le système ERAD. Enfin, si ces trois stratégies n'ont pas permis de rétablir l'homéostasie du RE, l'UPR déclenche l'apoptose [83, 84]. Quatre protéines vont être au cœur de la mise en place du système UPR : BiP, *Protein Kinase RNA* (PKR)-*like ER Kinase* (PERK), *Inositol-Requiring Enzyme 1*(IRE1) et *Activating Transcription Factor* (ATF) 6.



Figure 11 : Schéma récapitulatif du rôle général de l'UPR. En situation de stress du RE, l'UPR est déclenchée et les trois stratégies de cette réponse consistent à diminuer la traduction générale au sein de la cellule, augmenter les capacités de repliement des chaperons et promouvoir la dégradation des protéines mal repliées retenues dans le RE. Si l'homéostasie du RE n'est pas rétablie, l'UPR déclenche la mort cellulaire programmée de la cellule. (D'après Walter et Ron, 2011)

c. Les différents effecteurs de l'UPR

a) BiP

BiP est codée par le gène *HSPA5* (retrouvé dans tout l'empire eucaryote [85]) et appartient à la famille protéique des HSP70 [74]. A la différence des autres HSP70, BiP possède un peptide signal lui permettant sa translocation dans le RE et un domaine KDEL lui permettant de rester dans la lumière du RE et de pas être sécrétée ou exportée vers un autre compartiment cellulaire [86].

Le rôle principal de BiP est celui de chaperon moléculaire. Cette fonction est rendue possible grâce à sa structure 3D permettant la fixation de BiP aux protéines naissantes, mal repliées ou dénaturées ; de manière générale aux protéines extériorisant des résidus hydrophobes. Pour cela, BiP est constituée, comme toutes les HSP70, de deux domaines majeurs : un domaine de fixation au nucléotide (*Nucleotide Binding Domain* (NBD)) en N-terminal et un domaine de fixation du substrat (*Substrate Binding Domain* (SBD)) en C-terminal (Figure 12) [87, 88].



Figure 12 : Schémas représentatifs de la structure de BiP. Schéma du haut : structure primaire de BiP où sont représentés quatre domaines majeurs : le peptide signal, le NBD, le SBD et le domaine KDEL (de gauche à droite). Schéma du bas : structure 3D des deux domaines principaux de BiP, à gauche le NBD et à droite le SBD. (D'après Wang et al., 2017)

Le NBD est le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP en ADP. L'interaction de BiP avec une protéine est en effet ATP-dépendante et basée sur un cycle allostérique. Lorsque l'ADP est fixée sur le NBD (conformation ADP-liée/fermée), le SBD est conformé de manière à être très affin pour le substrat. A l'inverse, lorsque BiP est dans une conformation ATPliée/ouverte, la structure de SBD est modifiée et son affinité pour le substrat est diminuée, permettant la libération du substrat. La fixation d'un nouveau substrat entraînera l'hydrolyse de l'ATP en ADP et ainsi de suite [89].

Ce mode de fonctionnement nécessite l'intervention de co-chaperons tels que les *ER-resident DNAJ protein* (ERdjs). Ces protéines, également appelées HSP40, se lient aux protéines mal

repliées et permettent la prise en charge de ces dernières par BiP [90, 91]. Outre le recrutement de BiP, les Erdjs ont un second rôle fondamental, celui de catalyser l'hydrolyse de l'ATP liée au NBD de BiP. En effet, l'activité ATPase de BiP étant peu efficace, les ERdjs sont cruciales pour hydrolyser l'ATP permettant la fonction de BiP [92, 93].

Une seconde catégorie de co-chaperons, les *nucleotide-exchange factor* (NEF), sont essentiels à la fonction de BiP. Ce sont en effet ces protéines qui vont permettre le rechargement de BiP en ATP, les deux principaux NEFs de BiP étant GRP170 et Sil1 [94, 95]. Ces deux protéines vont se lier à BiP (état ADP-liée) et déstabiliser le NDB, ce qui va entraîner la libération de l'ADP afin de permettre une nouvelle fixation d'ATP sur BiP [96, 97].

Les expériences de mutations dirigées (articles cités ci-dessus) réalisées sur ces différents cochaperons montrent qu'ils sont indispensables aux multiples fonctions de BiP.

(1) Fonctions de BiP dans le RE

Grâce à cette capacité à fixer les protéines extériorisant des résidus hydrophobes, BiP est au cœur du contrôle du repliement des protéines entrant dans le RE. BiP est retrouvée impliquée dans de multiples fonctions du RE.

En effet, des études réalisées sur la levure *S. cerevisiae* et sur des HEK-293TT ont montré que l'inhibition de BiP (grâce à un promoteur répressif ou par modulation des co-facteurs de BiP) empêche la sécrétion de certaines protéines transloquées post-traductionnellement (facteur α , invertase, sous-unité du virus de l'hépatite B) [98, 99]. Ces études montrent que BiP intervient dans la translocation de ces protéines. Brièvement, deux modèles s'affrontent. Le modèle du cliquet (« *ratchet model* ») où BiP empêcherait le retour de la protéine vers le cytosol et le modèle où BiP tirerait la protéine vers la lumière du RE (« *power stroke model* ») [100, 101]. Ces deux modèles s'accordent sur le fait que BiP agit de manière active, c'est à dire en consommant de l'ATP. Il a de plus été montré que BiP empêche les fuites d'ions tels que le calcium (Ca²⁺) du RE vers le cytosol en perméabilisant le pore Sec61 avant et au début de la translocation des protéines [102, 103]. BiP est impliquée d'une autre façon dans la régulation calcique en chélatant 25 % des ions Ca²⁺ grâce à son domaine NBD [104].

Comme nous l'avons vu précédemment (Partie I.a.c) et I.a.d)), BiP est une protéine centrale du contrôle-qualité des protéines résidentes du RE ou transitant par ce compartiment, en facilitant le repliement ou l'assemblage de ces protéines. BiP permet également d'empêcher l'agrégation des protéines mal repliées, ou si tel est le cas, de solubiliser les agrégats protéiques. Enfin, une autre fonction de BiP est la prise en charge par le système ERAD des protéines mal repliées.
(2) Autres localisations de BiP

En tant que protéine résidente du RE, BiP est au cœur de ce projet de thèse. Il est cependant important de noter que cette protéine est également présente dans d'autres compartiments cellulaires. La séquence primaire de BiP comporte un domaine KDEL en C-terminal, domaine empêchant la protéine d'être sécrétée du RE, cependant la localisation de BiP n'est en effet pas limitée à la lumière du RE.

Ainsi BiP a été retrouvée dans le noyau cellulaire (protection contre les dommages à l'ADN liés à l'apoptose), les mitochondries (régulateur de la balance énergétique durant le stress du RE) [105], le cytosol [106], le milieu extracellulaire et la surface des cellules (récepteur et transducteur de signaux impliqués dans la tumorogenèse) [107] (Figure 13). L'implication de BiP dans des pathologies telles que le cancer sera détaillée plus loin dans cette partie II.



Figure 13 : Schéma récapitulant les différentes localisations de BiP associées aux différentes fonctions. Ces localisations sont retrouvées dans des modèles cellulaires et des conditions spécifiques. (D'après Ni et al., 2011)

Il est clairement établi que BiP est impliquée dans une multitude de fonctions cellulaires dans différents compartiments de la cellule. Nous allons maintenant aborder le rôle le plus important de cette protéine : la détection du stress du RE, le déclenchement et la régulation de l'UPR permettant de lutter contre ce stress.

(3) BiP et l'UPR

En absence de stress du RE, BiP est liée aux trois effecteurs/transducteurs de l'UPR : IRE1, PERK et ATF6, trois protéines ancrées dans la membrane du RE et dans un état inactif. En se basant sur cette observation, il est depuis longtemps admis que la détection et le déclenchement de l'UPR relèvent exclusivement de l'action de BiP. Le modèle est le suivant : lorsqu'une quantité importante de protéines mal repliées est présente dans la lumière du RE, BiP qui a une meilleure affinité pour les protéines mal repliées se dissocie des trois effecteurs, déclenchant ainsi l'UPR [108-110]. Dans ce modèle, BiP agit en tant que capteur du stress du RE et régulateur négatif de l'UPR [111]. Toutefois, de récentes études remettent en question ce modèle. En effet, une équipe japonaise a montré en 2004 qu'en mutant IRE1 chez la levure de manière à abolir la liaison de BiP avec IRE1, l'UPR était quand même induite [112]. Cette étude tend à démontrer que ce ne serait pas BiP le déclencheur primaire de la réponse UPR mais plutôt IRE1. Ce modèle est soutenu par une étude de la structure du domaine luminal d'IRE1, montrant qu'IRE1 serait activé par liaison directe avec les résidus hydrophobes des protéines mal repliées du RE [113]. Ce modèle serait similaire pour PERK. Enfin une troisième étude montre que la dissociation entre BiP et ATF6 n'est pas suffisante pour activer ATF6. Les auteurs ont montré qu'en inhibant la PDI Family A Member 5 (PDIA5) par ARN interférence, l'activation d'ATF6 était également diminuée. ATF6 serait activée par la réduction des cystéines situées dans son domaine luminal et normalement cachées par la liaison BiP/ATF6 [114].

Il n'est pas encore possible de déterminer avec certitude quel modèle est valable ou si les deux modèles peuvent cohabiter, cependant lorsque IRE1, PERK et ATF6 sont activés, ces protéines vont déclencher une série de cascades de signalisation (décrites dans les paragraphes suivants) permettant de rétablir l'homéostasie du RE (Figure 14).



Figure 14 : Schéma général de l'UPR comportant trois branches de signalisation induites par l'activation de PERK, IRE1 et ATF6, ainsi que les effets induits par l'UPR. (D'après Hetz et al., 2015)

Bien que ces trois voies interagissent entre elles, par souci de facilité d'explication chaque voie sera décrite une à une.

b) IRE1

IRE1 est l'effecteur d'une des deux voies transcriptionnelles de l'UPR et le premier effecteur à avoir été découvert à la fois chez la levure S. cerevisiae et chez l'homme. Comme mentionné plus haut, la levure, de par la simplicité de son génome, était le modèle favori pour étudier l'UPR. C'est J.S. Cox et coll. (laboratoire de P. Walter) et K. Mori et coll. (laboratoire de M-J. Gething et J. Sambrook) qui ont montré (par mutagenèse aléatoire et screening) l'implication d'IRE1 dans l'UPR chez la levure, quasi simultanément en 1993 [115, 116]. L'homologue mammifère IRE1 n'a été isolé que 5 ans plus tard par W. Tirasophon et coll. (laboratoire de R. Kaufman) [117]. IRE est l'effecteur de l'UPR le mieux conservé chez les eucaryotes et existe sous deux isoformes, IRE1 α et IRE1 β , respectivement retrouvées dans toutes les cellules et exclusivement dans les cellules épithéliales de l'intestin [118]. IRE1 est une protéine de type I ancrée dans la membrane du RE dont le domaine cytoplasmique comporte une activité kinase et endoribonucléasique. Lors de son activation (par dissociation de BiP et/ou interaction avec les protéines mal repliées) pendant un stress du RE, IRE1 s'oligomérise et se *trans*-autophosphoryle (Figure 15). Le changement conformationnel dû à cette phosphorylation active le domaine endoribonucléasique d'IRE1 [119], entraînant l'épissage de l'ARNm de *X-box binding protein 1* (XBP1). Ce clivage d'un intron de 26 pb change le cadre de lecture et induit la synthèse d'une forme alternative (XBP1s (s pour *spliced*)) de la protéine non clivée (XBP1u (u pour *unspliced*)) [120]. XBP1s, en se liant sur des séquences nucléotidiques *ER-stress response element* (ERSE) dans le noyau, induit la production de protéines impliquées notamment dans la dégradation des protéines via le système ERAD (protéines EDEM1 ou ERdj4 par exemple) [121]. Le but de cette voie IRE1 est entre autres d'augmenter les capacités de dégradation du RE afin de diminuer la quantité de protéines mal repliées dans la lumière du RE et atténuer par conséquent le stress du RE.

En outre, XBP1 induit l'expression d'une autre protéine impliquée dans l'apoptose : *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein* (CHOP) (cette partie sera détaillée plus loin) [122].



Figure 15 : Schéma descriptif de la voie IRE1 de l'UPR. En condition de stress du RE, IRE1 s'oligomérise et se transautophosphoryle afin d'activer son domaine endoribonucléasique, conduisant à l'épissage de l'ARNm de XBP1. La protéine traduite à partir de la forme clivée de l'ARNm, appelée XBP1s, migre vers le noyau et se fixe sur des séquences ERSE induisant la production de protéines notamment impliquées dans le système de dégradation ERAD. La forme non clivée XBP1u produite en fin d'UPR représente un rétrocontrôle qui inhibe l'UPR. (Modifié d'après Ron et Walter, 2006)

Comme beaucoup de systèmes de régulation, l'UPR possède des boucles de rétrocontrôle négatif. Dans la branche IRE1, deux de ces boucles sont activées. La première boucle est réalisée par la forme XBP1u, induite en fin d'UPR, qui agit en tant que répresseur des gènes de l'UPR. De plus, XBP1u peut se complexer à XBP1s. Etant donné que XBP1 est instable, ce complexe est rapidement dégradé par le protéasome, empêchant ainsi XBP1 d'induire des gènes de l'UPR [123]. Un second rétrocontrôle consiste à l'induction, lors de la fixation de XBP1s sur les séquences ERSE, de la production de P58^{IPK}, un inhibiteur de PERK, autre effecteur de l'UPR [121].

c) PERK

Un an après la découverte de l'homologue d'IRE1 chez les mammifères, H. P. Harding et coll. (laboratoire de K. Mori) ont mis en évidence une autre branche de l'UPR chez les mammifères : la voie PERK, ou voie traductionnelle [124] (Figure 16). L'objectif principal de cette voie de l'UPR est d'inhiber fortement et globalement la synthèse protéique dans la cellule afin de ne pas faire entrer davantage de protéines dans la lumière du RE déjà saturée en protéines mal repliées. PERK est une protéine de type I ancrée à la membrane et partage plusieurs similarités structurales avec IRE1, dont le domaine kinase cytosolique. Ainsi, une fois activée, PERK s'oligomérise, se *trans*-autophosphoryle afin de phosphoryler la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eucaryotic translation initiation factor-2 (eIF2). L'effet est quasiimmédiat : la phosphorylation de la sous-unité α d'eIF2 inhibe eIF2B, un facteur d'échange de nucléotides guanyliques qui a pour fonction normale de recharger eIF2 en guanosine triphosphate (GTP). L'initiation de la traduction par la reconnaissance du codon AUG se réalise grâce au complexe eIF2-GTP liée avec un ARN de transfert chargé avec de la méthionine (ARNt^{Met}). Lorsque PERK est activée, eIF2B est inhibé. Par conséquent, la forme GTP-liée de eIF2 est fortement diminuée, conduisant inévitablement à une forte inhibition de la traduction des protéines (nécessitant une reconnaissance d'un AUG pour initier la traduction) dans toute la cellule [125, 126].

Bien que la traduction soit inhibée dans toute la cellule durant les épisodes de stress du RE, l'expression de certains ARNm va être induite par la phosphorylation de la sous-unité α de eIF2. Cette induction transcriptionnelle est rendue possible par la présence de *upstream open reading frame* (uORF) dans la région 5' non codante de certains ARNm. En conditions normales ces uORF inhibent la traduction de l'ORF principal en réinitialisant la traduction à chaque fin de traduction des uORF. A l'inverse, en conditions de stress du RE, lorsqu'eIF2B

est inhibée et que eIF2-GTP liée est rare, les ribosomes ont le temps de scanner l'ORF principal avant d'être rechargés en GTP. Lorsque les ribosomes seront rechargés en GTP ils réinitialiseront la traduction sur l'AUG de l'ORF principal qui sera alors traduit [127]. Parmi les ARNm induits, on retrouve par exemple ATF4 qui, une fois traduit, agit en tant que facteur de transcription et induit l'expression de gènes impliqués dans le transport des AAs ou la résistance au stress oxydatif [128]. ATF4 induit également l'induction de gènes codant la protéine CHOP, impliquée dans l'apoptose [129].

De la même manière, une boucle de rétro-contrôle négatif est induite par l'activation de PERK. Ainsi, growth arrest and DNA-damage- inducible protein-34 (GADD34), une protéine transcriptionnellement co-induite par ATF4 et CHOP [130, 131], entraîne la déphosphorylation de la sous-unité α de eIF2 et met ainsi fin à l'inhibition de la traduction protéique [132]. Une autre protéine, constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation (CReP) qui, comme son nom l'indique est constitutivement exprimée, permet également de déphosphoryler eIF2 afin d'atténuer l'inhibition de la traduction induite par PERK [133].



Figure 16 : Schéma descriptif de la voie PERK de l'UPR. En condition de stress du RE, PERK s'oligomérise et se transautophosphoryle, entraînant la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction elF2. La phosphorylation de elF2 inhibe elF2B, ce qui empêche la formation de la forme GTP-liée d'elF2 essentielle à l'initiation de la traduction des protéines. La phosphorylation de elF2 induit également l'expression de certains ARNm tels que ATF4, entraînant l'expression de gènes impliqués dans le transport des AAs ou la réponse anti-oxydante. GADD34, induite par ATF4 et CHOP, ainsi que CReP, constitutivement exprimée, permettent d'atténuer l'inhibition de la traduction en déphosphorylant la sous-unité α de elF2. (D'après Ron et Walter, 2006)

d) ATF6

ATF6 est de la même manière que BiP au cœur de ce projet de thèse. ATF6 est le dernier transducteur de l'UPR à avoir été découvert.

En 1998, dans le laboratoire de K. Mori, Yoshida et coll. mettent en évidence, par screening de facteurs de transcription se fixant sur les séquences ERSE, l'implication d'ATF6 dans l'UPR et son rôle potentiel en tant qu'effecteur de l'UPR [134]. Ils observent que la transfection d'un plasmide codant ATF6 dans des cellules HeLa entraîne une augmentation des protéines GRP. Un an plus tard, en 1999, K. Haze et coll. parviennent à décrypter presque entièrement la voie de signalisation par laquelle ATF6 transmet le signal de l'UPR jusqu'au noyau cellulaire. L'équipe montre qu'ATF6, appartenant à la famille des ATF-cyclic-AMP-responsive-elementbinding protein (CREB) est une protéine de type II existante sous deux formes, une forme de 90 kDa (ATF6-90 kDa) et une forme de 50 kDa (ATF6-50 kDa). Les auteurs décrivent qu'en conditions normales, ATF6-90 kDa est ancrée dans la membrane du RE et ATF6-50 kDa est inexistante. En conditions de stress du RE, l'expression de ATF6-90 kDa diminue et il y a apparition de ATF6-50 kDa, protéine soluble, dans le noyau cellulaire. Agissant en tant que facteur de transcription, ATF6-50 kDa se fixe sur des séquences ERSE grâce à son domaine bZIP et induit l'expression de gènes codant BiP [135]. Les auteurs montrent également qu'ATF6-50 kDa n'est pas produite directement mais résulte du clivage de la forme ATF6-90 kDa. Les protéines responsables du clivage d'ATF6-90 kDa, site-1-protease (S1P) et site-2protease (S2P) seront découvertes plus tard grâce à l'homologie entre ATF6 et sterol regulatory element binding protein (SREBP), impliqué dans la synthèse des acides gras et du cholestérol [136]. En effet, dans cette étude les auteurs émettent l'hypothèse qu'ATF6 et SREBP empruntent la même voie de signalisation (Figure 17). Ainsi, une fois dissociées de la membrane du RE, ces deux protéines migrent vers l'appareil de Golgi où les deux protéases S1P et S2P opèrent un clivage permettant à la partie cytosolique de migrer vers le noyau afin d'agir en tant que facteur de transcription. Ainsi, en traitant à la tunicamycine (inhibiteur de la N-glycosylation) des lignées cellulaires déficientes en S1P ou S2P, les auteurs n'observent pas ou peu de clivage d'ATF6-90 kDa. Une autre équipe a confirmé cette étude et montré que le clivage doit d'abord être réalisé séquentiellement par S1P puis seulement après par S2P [137]. Il a également été montré que la migration d'ATF6-90 kDa du RE vers l'appareil de Golgi s'effectue via des vésicules COPII [138].

Une fois clivée, la fixation d'ATF6-50 kDa sur les séquences ERSE n'entraînent pas seulement la production de BiP mais également la production de son co-chaperon ERdj3, et des protéines

telles que GRP94 ou des PDI (ERO1 par exemple) [139]. ATF6-50 kDa induit également l'expression des gènes de P58^{IPK} et XBP1 dont l'ARNm est par la suite épissé par IRE1 [140]. Le but de l'induction de ces protéines en particulier est d'augmenter les capacités du RE à replier les protéines afin de diminuer la charge de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Grâce à des analyses par puces à ADN, Okada et coll. ont également montré en 2002 que ATF6 induit l'expression de CHOP, impliquant cette branche de l'UPR dans l'induction de la mort cellulaire [141].



Figure 17 : Schéma montrant l'homologie des voies d'activation des protéines ATF6 et SREBP. Les deux protéines sont maintenues inactives dans la membrane du RE puis, une fois dissociées de cette membrane, migrent vers le Golgi où S1P et S2P opèrent un clivage. Une fois la partie cytosolique N-terminale libérée, cette dernière migre vers le noyau et se fixe sur des séquences spécifiques. (D'après Kaufman et al., 2002)

Dans le paragraphe ci-dessus, le terme ATF6 regroupe les deux isoformes : ATF6 α et ATF6 β . Ces deux isoformes suivent exactement les mêmes voies d'activation mais diffèrent par les effets induits et leurs devenirs dans la cellule (cette différence est due à une séquence en AA différente dans le domaine N-terminal). Ainsi, ATF6 α est capable d'induire fortement l'expression de certains gènes lors de sa fixation sur les séquences ERSE et sera par la suite rapidement dégradée. Au contraire, le pouvoir transcriptionnel d'ATF6 β est plus modéré mais il est plus stable et sera donc moins rapidement dégradé. En fait, l'expression d'ATF6 α et ATF6 β va être finement régulée afin de moduler la transcription des gènes de l'UPR avec ATF6 β dans le rôle du régulateur négatif d'ATF6 α [142]. Il est important de noter que l'activation d'ATF6 lors d'un stress du RE n'est pas encore claire. Deux modèles sont actuellement en confrontation. Le premier modèle est basé sur le fait que c'est la dissociation de BiP qui active ATF6. En effet, lorsque BiP est liée à ATF6 en conditions normales, les deux domaines d'adressage vers le Golgi présents dans le domaine luminal d'ATF6 sont masqués [109, 143]. En se dissociant, BiP découvrirait ces deux domaines d'ATF6, induisant son transport vers l'appareil de Golgi. Le second modèle se base sur la présence de ponts disulfures grâce à des cystéines présentes également dans le domaine luminal d'ATF6. En conditions normales, ces ponts disulfures permettraient la dimérisation (ou oligomérisation) de ATF6 alors ancrée dans la membrane du RE [144]. Dans cet état, ATF6 ne peut pas migrer vers l'appareil de Golgi et reste inactive. Lors d'un stress du RE, ces ponts disulfures seraient réduits, permettant la monomérisation d'ATF6 et son transport vers le Golgi afin d'être clivée par S1P et S2P [114].

En résumé, l'UPR, induite en réponse à un stress du RE, consiste en l'activation de trois voies, IRE1, PERK et ATF6, qui agissent en parallèle afin de transmettre le message de stress du RE vers le noyau. Ces trois effecteurs activent différentes protéines permettant de 1) atténuer le flux de protéines arrivant dans la lumière du RE, 2) augmenter les capacités de repliement des protéines mal repliées dans la lumière du RE et 3) augmenter les capacités de dégradation par le système ERAD des protéines mal repliées accumulées dans le RE.

Deux alternatives se présentent, soit l'homéostasie du RE est rétablie et il y a alors inactivation de ces trois effecteurs de l'UPR, soit le stress est toujours présent. Dans ce dernier cas, plutôt que de mettre en péril la survie de l'organisme, l'UPR déclenche différents programmes cellulaires induisant l'apoptose de la cellule.

e) Induction de l'apoptose par l'UPR

Lors d'un stress du RE prolongé ou sévère, l'UPR active parallèlement plusieurs voies de signalisation conduisant à l'induction de la mort cellulaire (Figure 18).

Une des voies apoptotiques est directement activée par IRE1, capable de recruter *tumour necrosis factor receptor* (TNFR)-*associated factor-2* (TRAF2). Ce complexe va permettre l'activation de la cascade de signalisation des *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et de la caspase 12, deux voies de signalisation permettant l'entrée en apoptose de la cellule [145, 146].

Une autre voie induisant la mort cellulaire implique la protéine CHOP dont l'expression est induite par IRE1 (via XBP1), PERK (via ATF4) et ATF6 [122, 129, 141]. CHOP va induire

l'expression de *death receptor* 5, une protéine faisant partie intégrante du programme d'apoptose [147]. En outre, CHOP va réprimer des protéines anti-apoptotiques (familles Bcl2) et stimuler le facteur pro-apoptotique Bim [148, 149].

Ces deux voies, la cascade JNK et l'activation de CHOP, conduisent également à l'activation de Bax et Bak. Ces deux protéines s'insèrent alors dans la membrane et activent *inositol trisphosphate receptor*, une canal protéique impliqué dans la libération du Ca²⁺ du RE [150]. Cette libération massive de Ca²⁺ dans la cellule induit l'activation d'une calpaïne qui à son tour active la cascade de signalisation des caspases, menant à l'apoptose [151, 152].



Figure 18 : Schéma récapitulatif des différentes voies de signalisation induites par l'UPR lors d'un stress du RE sévère ou prolongé conduisant à l'entrée en apoptose de la cellule. (D'après Schönthal, 2009)

d. Pathologies impliquant le stress du RE et l'UPR et traitements possibles

Depuis plusieurs années, le stress du RE et l'UPR sont retrouvés impliqués dans une multitude de pathologies humaines [153, 154] telles que le cancer [155, 156], les maladies neurodégénératives [157], cardio-vasculaires [158], inflammatoires [159], virales [160],

métaboliques [161] et pulmonaires [162, 163]. Dès lors, le contrôle exogène des différents effecteurs de l'UPR dans certaines pathologies apparaît comme une solution thérapeutique envisageable [164, 165]. Plusieurs revues bibliographiques citées ci-dessus traitent de l'implication de l'UPR dans diverses pathologies. Dans ce paragraphe, je ne citerai que quelques exemples concrets impliquant les principaux effecteurs de l'UPR ainsi que les thérapies potentielles associées.

a) Exemple de l'implication de BiP dans certains cancers

Depuis quelques années, bien que PERK, IRE1 et ATF6 soient impliqués dans le développement de certaines tumeurs, c'est surtout BiP qui fait l'objet de multiples investigations dans ce type de pathologie. En effet, plusieurs études ont montré que BiP était surexprimée dans des cancers tels que le cancer du poumon, de la prostate, du sein ou du foie [86]. Cette surexpression s'explique principalement par l'environnement des tumeurs dépourvu de glucose et d'oxygène. La surexpression de BiP, de par son rôle anti-apoptotique, augmente les capacités de prolifération, la survie et l'entrée en stade métastasique des cellules cancéreuses, et de ce fait est corrélée à un mauvais pronostique [166]. De plus, plusieurs études ont mis en évidence la présence de BiP à la surface des cellules cancéreuses, jouant un rôle de transduction de signaux anti-apoptotiques permettant la survie des cellules cancéreuses ainsi que la résistance des tumeurs aux chimiothérapies [167, 168].

Ces recherches ont permis d'aboutir à la découverte d'une combinaison de deux molécules thérapeutiques (OSU-03012 et un inhibiteur de la phosphodiestérase) très prometteuse. Les travaux de Booth et coll. ont permis de mettre en évidence que l'inhibition de BiP avait un réel impact bénéfique dans le traitement des cancers. Sur plusieurs types de cellules cancéreuses (neurones, cellules gastro-intestinales, uro-génitales, etc.), les auteurs ont pu constater que leur traitement détruisait exclusivement ces cellules par l'intermédiaire de l'inhibition de BiP [169].

b) Exemple de la voie IRE1 dans le diabète de type 2

L'insuline est une protéine sécrétée dans le flux sanguin par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas lors d'une hyperglycémie et permet d'augmenter l'absorption du glucose présent dans le sang par les cellules hépatiques, adipeuses ou musculaires. De par cette activité sécrétoire, ces cellules sont pourvues d'un RE très développé permettant de répondre à une forte demande en insuline. De plus, en raison de la forte productivité de ces cellules (1 000

000 de protéines d'insuline par minute et par cellule [170]), ces dernières sont régulièrement soumises à un stress du RE. C'est pourquoi l'UPR, permettant de lutter contre ce stress, doit fonctionner de manière optimale [154].

Dans cet exemple, nous nous intéressons au diabète de type 2 (dit non insulino-dépendant) caractérisé par une résistance à l'insuline de l'organisme et une destruction des cellules β du pancréas. Ce type de diabète est très souvent lié à une obésité résultante d'un régime alimentaire riche en gras et en sucre [171]. L'excès de sucre et de lipides lié à la surconsommation nutritionnelle, ainsi que l'inflammation et la libération d'ERO liées à l'obésité, conduisent au déclenchement de l'UPR dans les cellules hépatiques, adipeuses et pancréatiques chez ces patients [172].

Dans les cellules β , le stress du RE est principalement induit par l'activation de la voie IRE1. Ainsi, cette dernière est responsable de l'altération de bons nombres de processus impliquant la synthèse, le repliement, la sécrétion ou la dégradation de l'insuline, ce qui conduit à la diminution de la production d'insuline [173]. De plus, lorsque le stress se prolonge, IRE1 déclenche l'apoptose via CHOP et la cascade des JNK, entraînant la destruction des cellules β du pancréas [174].

Dans les cellules adipeuses et hépatiques, il a également été montré que la voie IRE1 altère la voie de signalisation du récepteur à l'insuline, participant ainsi à l'augmentation de la résistance à l'insuline dans ces cellules [175].

Evidemment, plusieurs autres mécanismes dépendant ou non de l'UPR entrent en jeu dans cette pathologie. Cependant, la modulation d'une ou plusieurs protéines de la voie IRE1 représente une piste thérapeutique intéressante. En 2014 par exemple, une équipe chinoise travaillant sur des rats souffrant de cardiopathies liées au diabète a inhibé la voie IRE1, ce qui a permis d'améliorer la fonction cardiaque des rats [176].

c) Exemple de PERK dans la maladie d'Alzheimer

La voie PERK de l'UPR est connue pour être impliquée dans plusieurs pathologies, la plus connue étant le syndrome de Wolcott-Rallison. Brièvement, ce syndrome se caractérise notamment par une destruction précoce des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas entraînant un diabète de type 1. Dans cette pathologie rare induite par la mutation du gène codant la protéine PERK, cette dernière n'est plus en mesure de phosphoryler la sous-unité α d'eIF2. Il en résulte une régulation altérée de la synthèse protéique et une accumulation

d'insuline dans le RE causant un stress. Ce dernier induit l'UPR qui à terme conduit à l'apoptose des cellules entrainant ainsi le diabète [177].

PERK a également été retrouvée impliquée dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer [178]. Cette dernière se caractérise principalement par une perte progressive des capacités de mémorisation et cognitives des patients, occasionnée entre autres par la présence de plaques amyloïdes extracellulaires et une accumulation intracellulaire de la protéine Tau [6]. C'est cette accumulation qui est en partie responsable du stress du RE et du déclenchement de l'UPR retrouvés dans les neurones de patients, avec notamment la surexpression de BiP et de la voie PERK [7]. Le lien entre PERK et les symptômes de la maladie d'Alzheimer ne sont pas encore clairs mais l'activation de cette voie de l'UPR serait à l'origine d'une diminution de la synthèse protéique dans les neurones entraînant une diminution de la fonction synaptique. En outre, l'activation de PERK occasionne l'activation d'ATF4 et de CHOP, induisant l'apoptose et la dégénération neuronale [179]. Ainsi, une équipe a pu montrer en 2015 que l'inhibition chimique (par le GSK2606414) spécifique de PERK permettait une réduction de la neuro-dégénération chez des souris traitées développant des symptômes semblables à ceux de la maladie d'Alzheimer [180].

L'inhibition de PERK et/ou de la phosphorylation d'eIF2 dans la maladie d'Alzheimer n'est qu'un exemple. Comme dit plus haut, PERK est retrouvée augmentée dans d'autres pathologies neurodégénératives et des traitements par l'inhibition semblent être une piste prometteuse.

d) Exemple d'ATF6 dans l'ischémie-reperfusion

Comparé à BiP, IRE1 et PERK, très peu d'études rapportent l'implication d'ATF6 dans des pathologies. Cette différence est probablement due au fait que cette voie de l'UPR est moins étudiée que les deux autres. Certains auteurs se sont tout de même penchés sur la question et ont montré que la voie ATF6 de l'UPR est impliquée dans la résistance des glioblastomes à la radiothérapie [181]. ATF6 serait également impliquée dans des processus de réplication virale dans les cellules eucaryotes [182].

Une des dernières études en date portant sur ATF6 a démontré que cet effecteur de l'UPR avait un rôle protecteur en diminuant les effets délétères de l'ischémie-reperfusion [183]. Cette dernière est notamment associée à une importante quantité d'ERO, toxiques pour la cellule. Les auteurs de l'étude ont montré que l'inhibition d'ATF6 dans des cardiomyocytes de souris augmentait les dommages cellulaires et la mort cellulaire par nécrose. La diminution des

altérations liées à l'ischémie-reperfusion passerait notamment par l'induction de la catalase, une protéine permettant de lutter contre les ERO, par ATF6. A la suite d'une analyse par micropuce, les auteurs montrent qu'ATF6 permet l'induction de plusieurs autres gènes impliqués dans la protection cellulaire face aux ERO. Cette étude suggère un nouveau rôle d'ATF6 dans la lutte contre le stress oxydatif.

Les molécules activatrices et inhibitrices développées par le laboratoire de Peter Walter à San Francisco se sont révélées être très spécifiques d'ATF6 α [184]. Les *ceapins* sont en effet capables d'inhiber l'activation d'ATF6 α sans affecter IRE1 ni PERK [185]. Ces modulateurs d'ATF6 α sont les premiers à être réellement spécifiques de cette branche de l'UPR et pourront être testés dans des pathologies où ATF6 est suspectée d'être impliquée.

e) TRPM7 et ATF6

Une récente étude de 2016 a démontré que l'expression du *transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7* (TRPM7) (Figure 19) était diminuée dans un autre modèle d'ischémie [186]. Ce canal kinase ubiquitaire est le principal régulateur de la concentration intracellulaire en magnésium (Mg^{2+}) ($[Mg^{2+}]_i$), notamment en faisant entrer le Mg^{2+} dans la cellule [187]. Il est activé par une faible $[Mg^{2+}]_i$ et inhibé par une forte $[Mg^{2+}]_i$ [188]. Par ailleurs, il est impliqué dans divers processus cellulaires [189] tels que l'autophagie [190], la maturation neuronale [191] et de nombreux cancers [192, 193].



Figure 19 : Schéma simplifié de la structure de TRPM7. En N-terminal, un domaine melastatine suivi de six domaines transmembranaires. Le pore est constitué par le S5 et S6. En C-terminal, un domaine TRP suivi d'un domaine coiled-coil (superhélice) et un domaine kinase contenant un NBD. (D'après Park et coll, 2014)

ATF6 étant activée lors d'épisodes ischémiques, l'hypothèse de l'existence d'un lien entre l'inhibition de TRPM7 et l'activation d'ATF6 semble concorder avec une autre étude où l'inhibition chimique de TRPM7 conduit notamment à l'activation de BiP, ATF6 et XBP1 [194]. D'autres études ont également montré que l'inhibition de TRPM7 par ARN interférence augmente l'expression de CHOP et induit l'apoptose [195].

Comme dit précédemment, l'UPR est également impliquée dans certaines pathologies pulmonaires, et notamment la mucoviscidose. Cette maladie, que je vous présenterai dans la troisième partie de cette introduction, est utilisée comme modèle d'étude des deux projets composant cette thèse.

III. La mucoviscidose

a. Généralités

Bien que l'apparition de cette maladie soit très ancienne selon les estimations [196], les premiers écrits faisant part de cette pathologie remontent (seulement) au Moyen Âge, témoignant notamment des tristement célèbres enfants dits ensorcelés et au baiser salé [197]. Il faut cependant attendre 1936 pour que le Dr. Guido Fanconi réalise une réelle première description de la maladie [198]. Fanconi observe deux atteintes majeures, une fibrose pancréatique et une dilatation des bronches. En 1938, le Dr. Dorothy Andersen confirme ces observations et donne un nom à cette maladie : fibrose kystique du pancréas [199], donnant lieu au nom anglais de la maladie *cystic fibrosis* (CF). Le terme mucoviscidose (composé des mots mucus et visqueux et utilisé dans plusieurs langues, dont le français) provient du Dr. Syndney Farber qui est convaincu que la maladie est associée à une viscosité du mucus globale plutôt qu'à une fibrose pancréatique [197].

Par la suite, plusieurs découvertes conséquentes ont pu permettre l'avancée des connaissances sur la mucoviscidose. En 1946, Andersen démontre que la maladie suit un mode autosomal récessif [200]. En 1959, Gibson et Cook mettent au point le principal test de dépistage de la maladie (test de la sueur) en se basant sur les travaux de Di Sant'Agnese et coll. [201]. Ces derniers avaient pu mettre en évidence six ans plus tôt la présence d'un excès de sel (NaCl) dans la sueur des patients atteints de mucoviscidose [202]. Ce test permet de mesurer dans la sueur la concentration en ions chlorures (Cl'), retrouvée plus élevée chez les patients à cause d'une imperméabilité au Cl⁻ des cellules épithéliales des glandes sudoripares (test positif pour des [Cl⁻]> à 60 mM) [203]. Deux ans auparavant, Knowles et coll. avaient démontré que la différence de potentiel nasal (DPN) était augmentée chez les patients. Les auteurs en ont conclu que cette différence était occasionnée par une augmentation de l'absorption d'ions sodiques (Na⁺) par les cellules épithéliales nasales chez les patients [204]. Ces deux études ont permis de mettre en évidence pour la première fois un défaut de transport et d'échange des ions dans cette maladie.

Enfin, c'est une équipe de Toronto qui fournit une explication quant à l'origine moléculaire de la mucoviscidose. Un des premiers pas fut la découverte en 1985 de la localisation du gène *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (cftr)* dans la région 3 du bras long du chromosome 7 (locus 7q31.2) par Lap-Chee Tsui et coll. [205]. Le travail de Tsui et ses

a) La mucoviscidose à travers le temps...

collègues se concrétise en 1989 par une avancée majeure dans la compréhension de la mucoviscidose avec le clonage du gène *cftr* et la mise en évidence de la mutation F508del présente chez approximativement 70 % des patients [206-208]. Cette mutation est caractérisée par une délétion de trois nucléotides dans le gène *cftr*, se traduisant par la perte d'une phénylalanine (F) en position 508 de la protéine CFTR. Cette mutation conduit à une protéine CFTR-F508del composée de 1 479 AAs au lieu de 1 480 pour le CFTR-WT (forme sauvage=*Wild type*). La délétion de ce seul AA est responsable d'une forme sévère de mucoviscidose et la plus répandue à travers le monde.

b) ... et à travers le monde

La mucoviscidose est souvent présentée à raison comme la maladie autosomale récessive létale la plus fréquente dans la population caucasienne, avec une incidence atteignant un enfant sur 2 500 naissances par an dans cette population (Figure 20).



Figure 20 : Graphique représentatif des différences d'incidence de la mucoviscidose entre les différentes ethnies humaine. (D'après CDC Cystic Fibrosis, 2007)

En Europe, cette incidence est plus faible avec à 1 enfant atteint sur 3 500 naissances par an [209], mais des disparités sont observées au sein de ce continent. Ainsi, la Finlande compte un nouveau cas sur 25 000 naissances atteint alors qu'en France un enfant sur 4 500 naissances est atteint par la mucoviscidose [210]. De la même manière, il existe en France des différences d'incidence selon les régions. Selon les données de 2015 du Registre Français de la Mucoviscidose, l'incidence dans le Languedoc-Roussillon est de 1/8 000 naissances alors qu'en Bretagne, région très touchée par cette pathologie, elle est de 1/3 000 naissances. Cette disparité régionale est représentée sur la Figure 21 qui montre la prévalence (nombre de personnes malades pour 100 000 habitants) en France en 2015.



Figure 21 : Prévalence de la mucoviscidose en France selon le Registre français de la mucoviscidose 2015.

Quand on parle de mucoviscidose, ce terme regroupe les 2 017 mutations connues à ce jour (*http://www.genet.sickkids.on.ca*). Il est fort probable qu'au moment où vous lirez ces lignes ce nombre de mutations aura encore augmenté. La distribution de ces mutations n'est pas égale. Comme mentionné plus haut, la mutation la plus fréquente rencontrée dans la mucoviscidose est la mutation F508del. En 2015 en France, cette mutation est présente en au moins une copie chez 83,3 % des patients (proportion : 41,9 % homozygotes F508del et 41,4 % hétérozygotes F508del/Autre), selon le Registre Français de la Mucoviscidose Figure 22. Toujours selon ce même registre, parmi les 2 017 mutations recensées, seule une quinzaine (autres que F508del) représentent plus de 1 % des patients. Les deux mutations F508del et G551D indiquées sur la Figure 22 sont celles qui ont servi de modèle dans ce projet de thèse.

| Mutations | Nombre de patients * | Proportion (en %) |
|----------------|----------------------|-------------------|
| F508del | 5453 | 83.3 % |
| G542X | 353 | 5.4 % |
| N1303K | 279 | 4.3 % |
| 2789+5G->A | 159 | 2.4 % |
| 1717-1G->A | 136 | 2.1 % |
| R117H | 130 | 2.0 % |
| R553X | 120 | 1.8 % |
| G551D | 113 | 1.7 % |
| W1282X | 92 | 1.4 % |
| 3849+10kbC->T | 88 | 1.3 % |
| 3272-26A->G | 80 | 1.2 % |
| Y122X | 74 | 1.1 % |
| L206W | 71 | 1.1 % |
| D1152H | 69 | 1.1 % |
| l507del | 69 | 1.1 % |
| 2183AA->G | 64 | 1.0 % |
| 711+1G->T | 62 | 0.9 % |
| R1162X | 57 | 0.9 % |
| R347P | 56 | 0.9 % |
| 3120+1G->A | 48 | 0.7 % |
| G85E | 45 | 0.7 % |
| R334W | 45 | 0.7 % |
| 3659delC | 43 | 0.7 % |
| A455E | 42 | 0.6 % |
| Y1092X | 41 | 0.6 % |
| S945L | 39 | 0.6 % |
| 1078delT | 36 | 0.5 % |
| 1811+1.6kbA->G | 36 | 0.5 % |
| R347H | 36 | 0.5 % |
| 394delTT | 33 | 0.5 % |
| W846X | 29 | 0.4 % |
| 621+1G->T | 27 | 0.4 % |
| S1251N | 25 | 0.4 % |
| E60X | 24 | 0.4 % |
| R1066C | 24 | 0.4 % |
| L997F | 19 | 0.3 % |
| 1677delTA | 18 | 0.3 % |
| E585X | 18 | 0.3 % |
| G1244E | 18 | 0.3 % |
| 2711delT | 17 | 0.3 % |

Figure 22 : Tableau présentant les mutations de la mucoviscidose les plus fréquentes dans la population française en 2015. Le nombre de patients prend en compte les personnes ayant au moins une copie de la mutation considérée. Encadrées en rouge, les mutations F508del et G551D sont celles étudiées dans ce projet de thèse. (Modifié d'après le Registre Français de la Mucoviscidose, 2015)

b. Le gène *cftr* et la protéine CFTR

a) Structure et fonctionnement de la protéine CFTR(1) Structure

Le CFTR est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC), c'est-à-dire que l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire au fonctionnement du canal. Ces transporteurs ABC partagent une structure similaire, ils sont tous composés de deux domaines transmembranaires (en anglais *transmembrane domain* (TMDs) également abrégé *membrane spanning domain* (MSDs)), et deux NBDs permettant la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. En plus d'être le seul transporteur ABC à exporter des ions à l'extérieur de la cellule, le CFTR est également le seul canal de cette famille qui possède un domaine appelé domaine régulateur (R) situé entre le NBD1 et le TDM2 (Figure 23) [211].



Figure 23 : Schéma représentatif de la structure primaire (a) et la structure 3D transmembranaire (b) de la protéine CFTR. (D'après Ratjen et al, 2015)

Chaque TMD est composé de six hélices α hydrophobes transmembranaires (TM) reliées entre elles par des boucles intra ou extracellulaires Figure 24. Les deux TMD ancrent le

CFTR dans la membrane et forment le pore par lequel les anions sont transportés vers l'extérieur de la cellule [212].



Figure 24 : Modèle théorique de la structure du CFTR-WT. (D'après Serohijos et al, 2008)

A l'instar des extrémités N et C-terminales, les deux NBDs du CFTR sont cytosoliques. Ces domaines vont permettre la fixation de l'ATP dont l'hydrolyse (pas de manière égale sur les deux NBDs) est nécessaire à l'ouverture du canal. Ces deux NBD sont constitués chacun de deux sous-domaines : un sous-domaine composé d'hélice α et un sous-domaine constituant le site catalytique où sont notamment retrouvés les fameux motifs de Walker. Ces sites A et B de Walker permettent la fixation de l'ATP et du Mg²⁺ jouant le rôle de co-facteur catalytique [213]. Enfin, le domaine R présente une structure désordonnée avec quelques hélices α . L'importance du domaine R réside principalement dans ses nombreux sites de phosphorylation. Les possibles

interactions du domaine R avec les domaines NBD1, NBD2 et l'extrémité C-terminale du CFTR en font un domaine central dans la régulation du canal CFTR [214].

(2) Fonctionnement

L'ouverture et la fermeture du canal CFTR requiert deux éléments : la phosphorylation du CFTR et la liaison de l'ATP sur les NBDs.

En effet, la première condition permettant l'ouverture du canal est la phosphorylation du domaine R. Cette phosphorylation est réalisée principalement par les protéines kinases A (PKA) et C (PKC). La phosphorylation du domaine R permettrait de faciliter la liaison de l'ATP aux NBDs [215].

Concernant la fixation de l'ATP, le modèle admis actuellement décrit un changement conformationnel à la suite de la liaison de l'ATP sur les NBDs Figure 25. La fixation de l'ATP sur le NBD1 et le NBD2 induit la dimérisation de ces deux domaines, ce qui entraîne un changement de la structure 3D des TMDs et permet ainsi l'ouverture du canal CFTR. Lorsque l'ATP est hydrolysée, la liaison NBD1-NBD2 est déstabilisée, ce qui permet la libération de l'ADP. Cette libération induit un retour dans un état conformationnel des TMDs permettant la fermeture du canal CFTR. Ce seraient les boucles intracellulaires (2 et 4) du CFTR qui réaliseraient la transduction du message entre la dimérisation des NBDs et le changement conformationnel des TMDs [216].



Figure 25 : Schéma du modèle d'ouverture et de fermeture du canal CFTR. Lorsque les NBD ne fixent aucune molécule d'ATP le canal est en position fermé. La fixation de l'ATP sur NBD1 et NBD2 va entraîner leur dimérisation. Cette dernière provoque un changement conformationnel des deux TMD permettant ainsi l'ouverture du canal. Une fois l'hydrolyse de l'ATP et le retrait de l'ADP effectués, le canal revient en position fermé. (D'après Moran, 2017)

b) Biogénèse et contrôle qualité du CFTR

(1) Biogénèse et insertion

Du gène à la protéine, la biosynthèse du CFTR est complexe et nécessite l'intervention d'une multitude de protéines chaperons. Cette biosynthèse du CFTR fait intervenir plusieurs entités cellulaires : le noyau, le cytosol, la membrane du RE, la lumière du RE, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Figure 26).



Figure 26 : Schéma simplifié de la biosynthèse du CFTR. Y figurent les différents compartiments cellulaires impliqués dans cette synthèse. Le gène est transcrit dans le noyau et l'ARNm traduit dans le cytosol. Le CFTR subit ensuite une maturation dans le RE puis est exporté vers l'appareil de Golgi avant de rejoindre la membrane apicale des cellule épithéliales. (D'après Pranke et al, 2014)

Le gène *cftr* est composé de 27 exons répartis sur 250 kilobases (kb) [217]. Une fois le gène transcrit dans le noyau, l'ARNm de 6,1 kb est épissé puis exporté vers le cytosol où il est pris en charge par des ribosomes. Le CFTR étant une glycoprotéine destinée à rejoindre la

membrane, son passage par le RE est obligatoire. Le CFTR est inséré co-traductionnellement dans la membrane du RE de la même manière que sur la Figure 5 (I. b. a).

Pour ce faire, TM1 se lie à la SRP par l'intermédiaire de son peptide signal puis est inséré dans le pore de translocation Sec61, suivi par le TM2. L'insertion dans la membrane fonctionne par paire. Ainsi, lorsque les deux TM sont dans le pore, ils sont insérés dans la membrane du RE. Dans la plupart des cas, le TM1 ne parvient pas à fixer la SRP, c'est donc le TM2 (qui possède également un peptide signal) qui est fixé par la SRP. Le TM2 est ainsi transloqué en premier dans le Sec61 puis le TM1 est inséré de manière post-traductionnelle. Le pore s'ouvre ensuite latéralement et les deux TM (1 et 2) sont insérés dans la membrane du RE (Figure 27).



Figure 27 : Schéma de l'insertion des deux premiers TMs du CFTR dans la membrane du RE. A gauche, le TM1 est fixé à la SRP et donc inséré en premier dans le Sec61, suivi par le TM2 : l'insertion est co-traductionnelle. A droite, le TM1 n'a pas fixé la SRP. C'est le TM2 qui en ayant fixé la SRP est inséré en premier dans le pore (insertion co-traductionelle) puis le TM1 est inséré (insertion post-traductionnelle). Une fois les deux TM dans le pore, ce dernier s'ouvre est les deux TM sont insérés. (D'après Lu et al, 1998)

Le cas serait similaire pour les TM3 et TM4. L'insertion des TMs continue jusqu'à ce que les six TMs du TMD1 du CFTR soient insérés dans la membrane du RE [218]. Le NBD1 et le domaine R sont ensuite traduits dans le ribosome et se replient co-traductionnellement. Puis les six TMs du TMD2 sont insérés dans la membrane du RE, suivi du NBD2 qui se replie également co-traductionnellement [219]. Lorsque la quatrième boucle extracellulaire est dans la lumière du RE, le CFTR subit une première glycosylation à partir de cette boucle. La protéine passe de 130 kDa (bande A) à environ 145 kDa (bande B) [220].

A la fin de son insertion dans la membrane du RE, le CFTR est positionné de sorte que les extrémités N et C-terminales ainsi que les domaines NBD1, NBD2, R et les boucles intracellulaires, soient dans le cytoplasme. Les boucles extracellulaires sont dans la lumière du RE (Figure 28).



Figure 28 : Schéma des différentes étapes de l'insertion du CFTR dans la membrane du RE. Le TMD1 est d'abord inséré. Le NBD1 et le domaine R se replient co-traductionnellement dans le cytosol. Le TMD2 est ensuite inséré dans la membrane du RE. Enfin, le NBD2 se replie co-traductionnellement dans le cytosol. (Modifié d'après Farinha et Canato, 2017)

(2) Contrôle qualité

Dès sa synthèse et son insertion dans la membrane du RE, le CFTR est directement pris en charge par des protéines chaperons cytosoliques telles que *heat shock cognate* (HCS) 70, HSP70 et *human DnaJ homolog* (Hdj) 2. Ces protéines ont pour fonction d'assister le repliement co-traductionnel des différents domaines cytosoliques du CFTR. HSC70 est notamment impliquée dans la dégradation des protéines cytosoliques mal repliées [221]. Cette protéine est souvent associée à son co-facteur *C-terminus of Hsc70-interacting protein* (CHIP), une ubiquitine ligase E3. Cette dernière est notamment responsable de l'ubiquitinylation des protéines mal repliées afin qu'elles soient dégradées par le protéasome [222].

D'autres protéines chaperons cytosoliques telles que des *FK506 binding protein* (FKBP8), HSP90 et ses co-chaperonnes *Activator of Hsp90 ATPase Homologue* (Aha1) et *prostaglandin E synthase 3* (PGES 3), participent à la maturation finale du CFTR, et notamment à l'assemblage post-traductionnel des différents domaines cytosoliques [223].

Dans la lumière du RE, c'est surtout le système CNX/CRT/UGGT qui permet le contrôle du repliement du CFTR grâce au « glycocode » de la cupule glucidique (cf I. b. c). Des protéines résidentes du RE telles que BiP, GRP75 et plusieurs autres protéines chaperons ont été retrouvées dans des immunoprécipitats du CFTR (Figure 29) [224].



Figure 29 : Réseau des protéines chaperons impliquées dans le contrôle et/ou le repliement du CFTR (non exhaustif). Les lignes bleues symbolisent une interaction directe ou indirecte avec le CFTR. Les lignes rouges représentent les interactions entre les différentes protéines. Les ovales roses indiquent les protéines facilitant le repliement du CFTR. (D'après Wang et al, 2006)

Un troisième système de contrôle du CFTR est mis en œuvre juste avant sa sortie du RE vers le Golgi. Ce contrôle est basé sur l'exposition de motifs type Arginine/X/Arginine (R/X/R) où X représente n'importe quel AA. Si ces motifs sont reconnus, le CFTR ne peut être exporté vers le Golgi. Un dernier contrôle est effectué avant le transport du CFTR dans les vésicules COPII. Sec24, une protéine impliquée dans ce transport, reconnaît une séquence spécifique Asparagine/Alanine/Asparagine (DAD). Si cette séquence n'est pas conforme, l'association du CFTR avec Sec24 est diminuée, allant jusqu'à l'abolition de son transport vers le Golgi [225].

Une fois ces quatre points de contrôle passés, le CFTR est exporté du RE vers l'appareil de Golgi où il subira une dernière glycosylation, augmentant son poids moléculaire à environ 170 kDa (bande C), caractéristique de la forme mature du CFTR [220]. Une fois les différents sous-compartiments de l'appareil de Golgi traversés, le CFTR est exporté vers la membrane plasmique. Cependant, il semblerait qu'il existe différentes voies moins communes par lesquelles le CFTR serait exporté vers la membrane apicale des cellules [226].

c) Principales fonctions du CFTR

(1) Canal anionique

La fonction du CFTR est avant tout d'assurer le transport d'anions de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Le CFTR exporte de nombreux anions tels les ions iodures (Γ), bromures (Br^{-}), bicarbonates (HCO_{3}^{-}), nitrates (NO_{3}^{-}), thiocyanates (SCN^{-}) et le glutathion (GSH). L'ion le plus important reste l'ion Cl⁻ [215].

Le transport de Cl⁻ (en synergie avec les ions Na⁺ par un couplage fonctionnel avec *epithelium* Na^+ *channel* (ENaC)) à travers la membrane intervient dans plusieurs fonctions dont le maintien du volume du liquide de surface des voies aériennes (Figure 30). Par extension, les ions Cl⁻ libérés par le CFTR vont intervenir majoritairement dans les mouvements d'eau à la surface des cellules épithéliales.



Figure 30 : Schéma simplifié de la régulation du volume d'eau du mucus par la sécrétion d'ions $C\Gamma$ et Na^{\dagger} . Chez les personnes saines (en haut), la sécrétion de $C\Gamma$ par le CFTR et l'inhibition qu'il exerce sur ENaC permet l'hydratation du mucus. Chez les personnes CF (en bas), l'altération du CFTR inhibe la sécrétion d'ions $C\Gamma$ et lève l'inhibition de ENac. Cela induit une absorption excessive de Na^{\dagger} ainsi qu'une déshydratation du mucus. (D'après Buchanan et al., 2009)

Concernant le transport des ions HCO₃⁻, ces derniers vont notamment intervenir dans la régulation du pH en alcalinisant diverses solutions telles que les sucs pancréatiques ou la bile. Cette alcalinisation est d'une importance capitale dans les processus de digestion mais également dans les voies aériennes. Les ions HCO₃⁻ participent en effet à la structuration du mucus en se complexant à la mucine, composante majeure du mucus. Ainsi, le manque d'HCO₃⁻ dû à l'altération de la fonction du CFTR accentue les effets de la déshydratation et augmente la viscosité du mucus des voies aériennes. Le mucus intestinal est également concerné par l'altération de la sécrétion d'ions HCO₃⁻ [227, 228].

Le CFTR, par l'intermédiaire du transport des ions SCN⁻ et du GSH, intervient dans la mise en place des premières lignes de défense de l'organisme. Les ions SCN⁻, en tant que précurseurs de l'hypothiocyanite, participent à la lutte antimicrobienne. Le GSH est un tripeptide qui permet de contrer les effets oxydants des ERO libérées en grande quantité dans les voies aériennes lors d'épisodes inflammatoires [229].

Le CFTR n'est pas perméable aux ions Mg²⁺, mais en tant que co-facteur de l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à l'ouverture du CFTR, ce cation divalent représente un élément de régulation majeur de la fonction du CFTR. Des études de patch clamp ont d'ailleurs montré que l'ajout de Mg²⁺ dans la cellule permettait d'augmenter significativement les courants Cl⁻ liés au CFTR (en présence d'ATP) [230]. L'implication du Mg²⁺ dans l'hydrolyse de l'ATP par le CFTR avait également été démontrée par Schulz et al en 1996 [231].

De plus, l'expression de l'ARNm et de la protéine CFTR est également modulée par la $[Mg^{2+}]_i$. L'utilisation du ionophore A23187 permettant d'augmenter la $[Mg^{2+}]_i$, induit une diminution des ARNm et de la protéine CFTR [232].

La $[Mg^{2+}]_i$ doit donc être finement régulée afin d'optimiser l'expression et la fonction du CFTR dans les cellules exprimant cette protéine.

(2) Régulation d'autres canaux ioniques

Le CFTR intervient également dans la régulation d'autres protéines membranaires, et plus particulièrement de canaux ioniques.

On peut citer notamment la protéine *epithelium* Na⁺ *channel* (ENaC), localisée à la membrane des cellules épithéliales et responsable de l'absorption des ions Na⁺. Chez des personnes saines, le CFTR inhibe partiellement l'activité des canaux ENaC. A l'inverse, chez les patients atteints de mucoviscidose, le CFTR étant altéré, cette inhibition est levée. Il en résulte une absorption

excessive de Na⁺ par les cellules épithéliales, augmentant ainsi les phénomènes de déshydratation observés dans cette pathologie.

Outre ENaC, plusieurs autres canaux tels que les Ca^{2+} -activated Cl⁻channels (CaCC), outwardly rectifying chloride channel (ORCC), les échangeurs HCO₃⁻/Cl⁻, renal outer medullary protassium channel (ROMK), etc. sont régulés par le CFTR (Figure 31). Le terme regulator de CFTR choisi par Riordan et ses collègues tire son origine de cette la capacité du CFTR a interagir avec les autres canaux ioniques afin de réguler la conductance transmembranaire et maintenir une homéostasie ionique des cellules épithéliales [233]. Lorsque le CFTR est altéré, cela induit un déséquilibre important des flux ioniques [234].

| Transport Protein Affected | Interaction | |
|---|---|--|
| ENaC | Inhibition of ENaC | |
| Na ⁺ /H ⁺ exchanger | Inhibition of Na ⁺ /H ⁺ exchanger | |
| HCO ₃ ′Cl⁻ exchanger | Activation of HCO3/Cl- exchanger | |
| ICOR Cl ⁻ channels | Activation of ICOR, conferring glibenclamide sensitivity | |
| Ca2+- and volume-activated Cl- channels | Activation/inhibition of Ca^{2+} and swelling-activated Cl^- channels | |
| ROMK2, Kir6.1 | Converring glibenclamide sensitivity to ROMK2 and Kir6.1 | |
| K _v LQT1 | Activation of K _v LQT1 in oocytes | |
| AQP3 | Activation of AQP3 | |
| Gap junction channels | Activation of gap junctions | |
| Mucus secretion | Exocytosis and mucus secretion | |
| ATP transport | ATP release by epithelial cells | |
| Glutathione transport | Activation of glutathione efflux | |

Figure 31 : Exemples de canaux ioniques ou de transports transmembranaires régulés par le CFTR. (D'après Kunzelmann, 2001)

c. Le CFTR F508del

a) Généralités

Comme dit précédemment, la mutation F508del est la mutation la plus fréquente parmi les 2017 mutations du CFTR recensées à ce jour. F508del appartient aux mutations de classe II, c'est-à-dire que le trafic du CFTR est altéré et ce dernier, retenu dans le RE, n'atteint pas la membrane plasmique (Figure 32).



Figure 32 : Image de microscopie confocale sur des macrophages humains représentant le CFTR (en blanc) et le noyau (en bleu). A gauche, le CFTR-WT est exprimé à la membrane plasmique. A droite, le CFTR-F508del est retenu dans le RE près du noyau. (D'après Del Porto et al, 2011)

La mutation F508del est localisée dans le domaine cytoplasmique NBD1 du CFTR. La protéine résultante de cette mutation est caractérisée par un poids moléculaire de 145 kDa, correspondant à une glycosylation partielle. Cette dernière est la marque d'un CFTR qui n'a pas de conformation 3D correcte et qui n'est donc pas exporté vers l'appareil de Golgi.

Une des premières conséquences de cette mutation est observée lors du repliement du CFTR-F508del. En effet, lors de sa synthèse et son insertion dans la membrane du RE, l'assemblage des différents domaines du CFTR ne s'effectue pas correctement. La mutation n'altère pas de manière significative la structure du NBD1 mais en revanche déstabilise la liaison entre le NBD1 et la boucle intracellulaire 4 du TMD2 [212]. Il en résulte des variations conformationnelles et une altération globale de l'assemblage des différents domaines du CFTR-F508del. Ce dernier est alors mal replié dans la membrane du RE et reconnu par les protéines chaperons. Ces chaperonnes et co-chaperonnes montrent d'ailleurs une plus forte et plus longue interaction avec le CFTR-F508del qu'avec le CFTR-WT, et seraient ainsi en partie responsables de la dégradation du CFTR par le système ERAD [235]. Ainsi, le sodium phénylbutyrate (4-PBA), connu pour restaurer partiellement le CFTR-F508del à la membrane cellulaire, agit notamment en inhibant HSC70. Cela confirme que cette protéine chaperon est en partie responsable, par son interaction avec CHIP, du blocage de la maturation et de la dégradation du CFTR-F508del [236]. Un autre exemple est celui de l'inhibition de Aha1, un co-facteur des HSP90 impliqué dans le repliement du CFTR. Cette inhibition entraîne la restauration du CFTR-F508del à la membrane [224].

Bien que la majorité du CFTR-F508del soit dégradée lors du premier contrôle via les chaperons cytosoliques, il semblerait qu'une autre voie de rétention et de dégradation du CFTR-F508del s'effectue par l'intermédiaire de la CNX, ayant une plus forte affinité pour le CFTR-F508del. En guise d'exemple, le miglustat permet *in vitro* la maturation et l'exportation à la membrane du CFTR-F508del en inhibant son interaction avec la CNX [237]. L'administration orale de cette molécule à des souris CF a montré une augmentation de la masse osseuse et de la vitesse de fabrication osseuse [238].

La modulation de l'expression de ces protéines chaperons semble être une voie thérapeutique prometteuse. D'autres inhibiteurs de HSC70 tels que l'apoptazole, le matrine ou la déoxyspergualine ont tous montré des effets positifs sur la maturation du CFTR-F508del [235].

b) CFTR-F508del et UPR

La rétention du CFTR-F508del dans le RE pourrait déclencher l'UPR. C'est en effet une des hypothèses émises depuis quelques années. Cette idée se base notamment sur le fait que l'UPR est déclenchée à la suite d'une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Dans le cas de la mutation F508del, la protéine est mal conformée et s'accumule dans le RE. Bien qu'encore controversée en raison d'une dégradation trop rapide du CFTR-F508del par le protéasome, cette hypothèse est néanmoins renforcée par le fait que plusieurs autres facteurs peuvent influer sur le déclenchement de l'UPR. En effet, même si l'accumulation de CFTR-F508del dans le RE n'était pas suffisante pour déclencher l'UPR, cette dernière peut en revanche être activée par le diabète, l'inflammation, les infections ou les ERO chez les patients atteints de la mucoviscidose. L'accumulation de différents facteurs de stress du RE peut permettre d'atteindre le seuil de déclenchement de l'UPR.

Plusieurs équipes ont donc cherché à savoir si l'UPR ou certaines voies de l'UPR étaient activées dans la mucoviscidose F508del.

En 2006, Nanua et coll. observent une activation anormale de l'UPR dans des cellules épithéliales de voies aériennes de donneurs homozygotes pour la mutation F508del. Les auteurs ont observé que l'expression des ARNm de XBP1 et CHOP étaient augmentées dans les cellules CF [239]. En travaillant sur deux lignées cellulaires (IB3-1 et C38), une autre équipe est parvenue aux mêmes résultats concernant la surexpression de ces protéines [240]. En revanche, ces deux études ne révèlent pas d'augmentation de l'expression de BiP, IRE1 ou PERK dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. Concernant BiP, bien qu'elle soit retrouvée dans l'interactome du CFTR-WT et F508del [241], il semblerait que cette protéine n'intervienne pas

dans le repliement du canal. Cependant, Kerbiriou et coll. ont montré dans une étude de 2007 qu'en plus de l'activation de la voie ATF6, l'expression de BiP était augmentée dans des cellules A549 exprimant un CFTR-F508del. L'observation de la surexpression de BiP est concordante avec les mesures réalisées par Gomes-Alves et coll. en 2010 sur des BHK-WT et BHK-F508del [242]. Une autre équipe a montré que la surexpression de F508del induisait l'expression de gènes codant BiP et XBP1 [243].

En résumé il semblerait que seules BiP et la voie ATF6 de l'UPR soient activées dans des cellules F508del. De manière intéressante, Kerbiriou et coll. avaient également montré que l'inhibition d'ATF6 par ARN interférence permettait une restauration partielle de la présence du CFTR-F508del à la membrane des cellules. Ces résultats sont en accord avec deux études ayant montré que le stress du RE et l'UPR répriment la transcription et altèrent la maturation du CFTR-WT et F508del [244]. Les mêmes auteurs ont montré l'année suivante qu'en se fixant sur le promoteur du *cftr*, ATF6 exerce une inhibition transcriptionnelle du CFTR par l'intermédiaire de processus d'acétylation des histones et de méthylation de l'ADN [245].

Dans des cellules exprimant un CFTR-F508del, 99 % de ce dernier est dégradé, et n'est donc pas exporté à la membrane [246]. Le peu de CFTR-F508del à la membrane ainsi que ses différents défauts fonctionnels entraînent plusieurs manifestations chez les personnes atteintes par la mucoviscidose.

d. Les atteintes

De par la fonction cruciale du CFTR au sein des cellules épithéliales, les mutations altérant l'activité de cette protéine ont un impact majeur sur le fonctionnement général des cellules épithéliales et celui de certains organes des patients.

Bien que l'atteinte principale soit d'ordre respiratoire, il est important de préciser qu'il s'agit d'une maladie causant des atteintes multiples de divers organes, nécessitant donc une prise en charge globale du patient : kinésithérapie, antibiothérapie, régime alimentaire adapté, etc. Selon la gravité et la présence ou non des symptômes, il est important de noter que ces atteintes sont très variables d'un patient à l'autre [247]. De plus, selon la mutation du *cftr*, les atteintes diffèrent. Ainsi, les mutations de classe I (pas de synthèse du CFTR), II (défaut de synthèse du CFTR) et III (défaut de fonction du CFTR) vont entraîner une forme de mucoviscidose dite sévère (atteintes respiratoires et pancréatiques fortes). A l'inverse, les mutations de classe IV (CFTR muté moins fonctionnel que le WT) et V (CFTR muté moins exprimé que le WT) vont permettre de conserver entre 3 et 10 % de l'activité du CFTR muté (comparé au CFTR-WT). La forme de mucoviscidose associée à ces classes de mutations est moins sévère [248].

a) Respiratoires

L'atteinte respiratoire est la manifestation qui induit le plus de mortalité chez les patients en France [249]. Le CFTR participe au maintien du volume du liquide de surface par la sécrétion d'ions CI⁻ et Na⁺ (ENaC). Ce transport ionique permet l'hydratation du liquide de surface du tractus broncho-pulmonaire. Ce liquide, faisant office d'interface entre l'air et les cellules épithéliales, participe notamment aux défenses de l'organisme. Grâce aux cils des cellules épithéliales, ce mucus est évacué vers la trachée. Chez les patients, l'altération de la fonction du CFTR induit un défaut de transport ionique entraînant une mauvaise hydratation du mucus des voies aériennes. L'hyperviscosité du mucus qui en résulte rend l'évacuation de ce dernier bien plus difficile (diminution de la clairance muco-cilliaire), entraînant l'accumulation du mucus dans les bronches [250]. Un environnement propice aux développements microbiens se crée, conduisant à une inflammation et une augmentation du risque d'infections polymicrobiennes. En effet, les bronches sont caractérisées par une extraordinaire richesse et une grande diversité des espèces bactériennes, virales et fongiques. Un cercle vicieux est alors entretenu conduisant à la destruction progressive des tissus qui elle-même entraîne une insuffisance respiratoire fatale pour le patient (Figure 33) [251, 252].



Figure 33 : Schématisation des conséquences d'une dysfonction de la protéine CFTR dans le tractus broncho-pulmonaire chez des patients. Le transport ionique est altéré, ce qui conduit à une mauvaise hydratation du mucus. Ce dernier s'accumule dans les bronches et crée une inflammation et un environnement favorable aux développements de micro-organismes. Il en résulte une dégradation progressive des tissus pulmonaires. (D'après Lopez-Pacheco)

b) Digestives

La mucoviscidose est souvent associée à une dysfonction du système bronchopulmonaire, de par la mortalité liée à cette atteinte. Il ne faut cependant pas oublier qu'une des plus anciennes traces connues de cette pathologie, celle de l'anatomiste Pieter Pauw en 1595, relate le décès d'une fillette de onze ans survenu à la suite d'une atteinte pancréatique [197]. Les organes digestifs tels que le système hépatobiliaire, le pancréas et le système gastrointestinal ne sont pas épargnés par la maladie (Figure 34) [253].



Figure 34 : Diagramme représentant l'impact de l'altération de la fonction du CFTR sur le pancréas, le système hépatobiliaire et le système gastro-intestinal (de gauche à droite). (D'après Sathe et Freeman, 2016)

(1) Pancréatiques

Près de 85 % des patients atteints de mucoviscidose sont touchés par une insuffisance pancréatique [254]. Les deux principales manifestations de l'atteinte pancréatique se caractérisent par une mauvaise absorption des nutriments et une fibrose du pancréas. En plus de sa fonction endocrine (sécrétion d'insuline), le pancréas a une fonction exocrine ayant pour but de libérer dans l'intestin des sucs pancréatiques constitués d'enzymes digestives. Chez une personne saine, le CFTR a pour fonction d'hydrater ces sucs pancréatiques grâce au transport de Cl⁻. De plus, le CFTR alcalinise la solution d'enzymes digestives dans le but de limiter leur précipitation (grande concentration d'enzymes) et de neutraliser les sucs gastriques acides. Cette alcalinisation essentielle est réalisée grâce à la sécrétion d'ions HCO₃⁻ par le CFTR. Chez les patients, le CFTR étant altéré, il n'y a pas ou peu de sécrétion de Cl⁻, donc pas assez d'hydratation des sucs pancréatiques, ce qui conduit à une très forte concentration des enzymes digestives dans les sucs pancréatiques. De plus, les ions HCO₃⁻ ne sont plus sécrétés, ce qui entraine un mauvais fonctionnement des enzymes digestives. Il en résulte une malabsorption des nutriments, conduisant à des carences alimentaires et les complications qui leurs sont liées (maladies, anémies, ostéoporose, etc.). L'agrégation des enzymes (par un pH trop acide et une trop forte concentration enzymatique créée par le manque d'eau) conduit à une obstruction des canaux pancréatiques, ce qui entraîne une fibrose du pancréas. Il y a également autodestruction du pancréas par les enzymes qui stagnent [255].

Cette fibrose peut s'étendre jusqu'au pancréas endocrine. La destruction des cellules β des îlots de Langerhans entraîne l'apparition d'un diabète chez les patients [256].

(2) Hépatobiliaires

Responsables de 3 % des décès des patients, les atteintes hépatobiliaires représentent la seconde cause de mortalité liée à la mucoviscidose en France [249]. Le CFTR n'est pas exprimé dans le foie mais dans la vésicule et les canaux biliaires. De la même manière que pour les canaux pancréatiques, la fonction du CFTR est de réguler le volume d'eau de la bile par les ions Cl⁻ et Na⁺, et l'alcalinisation essentielle de la bile par la sécrétion des ions HCO₃⁻. Chez les patients, l'altération du CFTR se caractérise par une bile épaisse (due au manque d'hydratation) et pas assez alcaline. Il en résulte une stagnation de la bile, l'apparition d'ERO et une augmentation de la toxicité liée aux composants de la bile. Cette toxicité s'étend aux cellules biliaires, puis aux hépatocytes et entraîne une inflammation pouvant engendrer à long terme une fibrose, une cirrhose et la destruction progressive du foie [257].

(3) Gastro-intestinales

A l'instar des atteintes hépatiques, les manifestations gastro-intestinales ont été mises en évidence à la suite de l'augmentation de l'espérance de vie des patients. Parmi les nombreuses atteintes gastro-intestinales, les plus fréquentes sont le reflux gastro-œsophagien, le syndrome d'obstruction intestinale distale et le bouchon méconial (ileus meconium). Le reflux gastro-œsophagien est provoqué par une augmentation du temps de présence du bol alimentaire dans l'estomac, la prise de médicament et une toux constante. L'altération du CFTR chez les patients entraîne la sécrétion d'un mucus épais responsable notamment de la formation d'un bouchon méconial chez les nouveaux-nés. Le syndrome d'obstruction intestinale distale, également appelé équivalent du bouchon méconial, est retrouvé chez 16 à 21 % des patients et présente les mêmes origines que le bouchon méconial [258].

c) Génitales

L'atteinte génitale est une des plus fréquentes manifestations liées à un défaut du CFTR, notamment chez les patients masculins. En effet, environ 98 % d'entre eux présentent une absence congénitale bilatérale des canaux déférents se traduisant par une azoospermie obstructive. Cela reste une hypothèse, mais la stérilité entraînée par cette atteinte aurait comme origine l'obstruction des conduits par un mucus trop épais [259].

e. Thérapies protéiques du CFTR

Les traitements actuels apportés aux patients sont pour la plupart symptomatiques et bien qu'ils aient permis une augmentation considérable de l'espérance de vie des patients, ils ne sont pas encore suffisants pour permettre un mode de vie normal. Ainsi, depuis un certain temps déjà, une partie des recherches s'oriente vers des thérapies protéiques ciblant directement le CFTR afin de supprimer ou atténuer fortement les atteintes liées à l'altération du CFTR. Ces thérapies doivent être adaptées, comme cité plus haut, aux différentes classes de mutations du CFTR existantes (Figure 35).


Figure 35 : Schéma récapitulatif des six classes de mutation répertoriées en fonction de l'impact sur le CFTR. La figure présente aussi l'impact majeur sur le CFTR, les principales mutations concernées et l'approche thérapeutique adoptés pour chaque classe de mutations. Les deux classes de mutations encadrées en rouge (II et III) sont les classes concernées par ce projet de thèse. (D'après Lopez-Pacheco, 2016)

Dans ce projet de thèse, les modèles d'étude ont porté sur la mutation F508del (classe II) et G5551D (classe III). Je ne vais donc vous présenter que les pistes thérapeutiques en lien étroit avec ces deux mutations, c'est-à-dire les correcteurs, les potentiateurs et les stabilisateurs du CFTR.

a) Correcteurs

Les correcteurs du CFTR concernent le traitement des mutations de classe II. L'enjeu majeur dans la recherche de correcteurs du CFTR réside notamment dans le fait que la mutation F508del, présente chez plus de 80 % des patients, fait partie de cette classe de mutation. Cette dernière est caractérisée par le fait que le CFTR muté, de par sa conformation alternative, est retenu dans le RE par le système de contrôle qualité des protéines. Une des nombreuses raisons poussant à évaluer l'efficacité de potentiels correcteurs est que le CFTR-F508del est un peu fonctionnel lorsqu'il est exporté à la membrane cellulaire. Plusieurs molécules telles que le glycérol, le 4-PBA, la thapsigargine, le triméthylamine N-oxyde ont déjà montré des résultats remarquables en promouvant l'exportation du CFTR à la membrane [260]. Cependant, le caractère relativement toxique de ces molécules ne permet pas une mise sur le marché. Plusieurs

autres molécules ont pu être testées au cours des dernières années et le Lumacaftor (VX-809) développé dans les laboratoires de Vextex Pharmaceuticals a montré de très bons résultats *in vitro*. *In vivo* en revanche, cette molécule n'a pas montré d'effets significatifs sur l'amélioration de la fonction pulmonaire [261].

Les études en cours portent également sur une autre molécule de Vertex Pharmaceuticals, le Tezacaftor (VX-661) qui a montré une diminution de la concentration en ions Cl⁻ dans la sueur de patients homozygote F508del après un mois de traitement par cette molécule [262].

b) Potentiateurs

Les potentiateurs visent dans un premier temps les mutations de classe III (et IV). Dans ces mutations, le CFTR est synthétisé et exporté à la membrane, mais il n'est pas ou peu fonctionnel. La mutation la plus fréquente de la classe III est la G551D, présente chez un peu plus de 3 % des patients. A l'heure actuelle, une seule molécule (développée par Vertex Pharmaceuticals), l'Ivacaftor (ou VX-770), commercialisée sous l'appellation Kalydeco, a montré une réelle efficacité de traitement des patients atteints de la mutation G551D. Le traitement par cette molécule, induisant une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal, a montré une augmentation significative du volume expiratoire et a pu être commercialisée en 2012 pour ces patients. Depuis 2015, l'Ivacaftor est également prescrit pour d'autres mutations de classe III [263].

c) Stabilisateurs

Les stabilisateurs du CFTR concernent le traitement des mutations de classe VI. Dans cette classe de mutation, le CFTR est normalement synthétisé, exporté à la membrane et fonctionnel. Cependant, le CFTR est très peu présent à la membrane car il est rapidement endocyté en raison de son instabilité. Un des stabilisateurs actuellement en évaluation est le Cavosonstat (N91115). Cette molécule développée par Nivalis Therapeutics permet l'augmentation de la stabilité du CFTR à la membrane en inhibant la S-Nitrosoglutathion réductase [264].

d) Associations de classes de médicaments

La recherche ces dernières années tend à ne plus utiliser les différentes molécules décrites ci-dessus seules mais en association entre elles. Ainsi, comme cité plus haut, le Lumacaftor n'a pas montré de résultats significatifs en monothérapie mais son association avec l'Ivacaftor a montré des résultats plutôt encourageants chez des patients homozygote F508del. Les résultats de phase II et III ont en effet montré que les patients traités avec l'association du Lumacaftor et de l'Ivacaftor présentent une concentration en ions Cl⁻ moindre dans la sueur et une amélioration significative de la fonction pulmonaire (volume expiratoire) [265]. L'association du correcteur et du potentiateur, commercialisée sous l'appellation Orkambi, a reçu une autorisation de mise sur le marché aux USA en 2015 (*www.fda.gov*).

L'association d'un correcteur et d'un potentiateur semble être une piste thérapeutique très prometteuse. Cependant, une étude de 2014 a montré que cette association pourrait être davantage efficace si les potentiateurs, dont l'Ivacaftor, n'altéraient pas la correction et la stabilité du CFTR [266]. Une étude clinique de phase II est d'ailleurs en cours afin de tester l'association de l'Ivacaftor, du Lumacaftor et du Cavosonstat [267].

Les différentes approches de ces thérapies protéiques semblent être prometteuses pour l'avenir et certaines de ces molécules sont même déjà commercialisées (Figure 36).



Figure 36 : Tableau récapitulatif des principales molécules correctrices ou potentiatrices du CFTR. Le tableau présente dans quelle phase clinique était la molécule en 2016. (Modifié d'après Fajac et al, 2017)

PROBLEMATIQUES DE LA THESE

Dans la première partie de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à l'UPR, une réponse physiologique déclenchée par un stress du RE. Ce mécanisme permet l'activation de différentes voies de signalisation dont chaque élément est coordonné dans le but de rétablir l'homéostasie du RE. Depuis quelques années, l'implication de l'UPR dans diverses pathologies a été démontrée. Dans ces maladies, les différentes protéines intervenant dans l'UPR ont montré des rôles aussi bien protecteurs que délétères. Ainsi, le contrôle des différentes effecteurs de l'UPR apparaît aujourd'hui comme une piste thérapeutique très prometteuse. Dans cette étude, nous avons voulu explorer l'impact de ce contrôle dans la mucoviscidose.

La mucoviscidose est une pathologie causée par une mutation du gène *cftr* affectant l'ensemble des épithéliums de l'organisme. Le gène muté code une protéine CFTR dont la fonction est altérée, ce qui conduit à la perturbation de nombreux processus cellulaires et aux atteintes connues de la maladie. La mutation F508del, la plus fréquente du *cftr*, est caractérisée par une conformation 3D du CFTR incorrecte conduisant à sa rétention dans le RE et sa dégradation par le protéasome.

En raison de nombreux facteurs endogènes (accumulation de protéines dans le RE) ou exogènes (inflammation, infection, diabète, etc.), plusieurs études ont montré que l'UPR, et notamment la voie ATF6, étaient déclenchées dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. Ces études ont également permis de mettre en évidence qu'ATF6 réprime transcriptionnellement le CFTR.

La branche ATF6 de l'UPR est donc au cœur de la relation directe existant entre le stress du RE, l'UPR et la protéine CFTR-F508del. ATF6 constitue donc une cible d'investigation importante en rapport avec la mucoviscidose.

Dans la première partie de cette étude, nous avons donc cherché à inhiber la voie ATF6 de l'UPR et à mesurer l'impact de cette répression sur la maturation et la fonction du CFTR-F508del.

En parallèle de cette première partie, nous nous sommes intéressés à la $[Mg^{2+}]_i$ et à TRPM7 dans la mucoviscidose, ce qui n'avait encore jamais été réalisé.

Nous avons vu précédemment que peu d'études ont été réalisées sur ATF6 et TRPM7 mais elles semblent montrer l'existence d'un lien entre ces deux protéines : l'inhibition de TRPM7 conduit à la surexpression de certaines protéines de l'UPR telles que BiP, ATF6, XBP1 et CHOP, ces mêmes protéines sont surexprimées dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. Des voies communes sont ainsi induites entre des cellules exprimant un CFTR-F508del et des cellules dont TRPM7 a été inhibé. Etant donné que TRPM7 est régulé par la [Mg²⁺]_i, nous avons émis l'hypothèse que des dérégulations de la [Mg²⁺]_i pourraient activer BiP et la voie ATF6 par

l'intermédiaire de TRPM7 dans des cellules exprimant un CFTR muté.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons choisi de séparer ce projet en deux grandes questions (cf. schéma ci-dessous).



Dans un premier temps, il était nécessaire de mesurer la $[Mg^{2+}]_i$ dans le but de savoir si oui ou non des dérégulations du Mg^{2+} étaient observées dans différents mutants du CFTR. Dans un second temps, il s'agira de faire le lien entre la $[Mg^{2+}]_i$, TRPM7 et ATF6, ce qui constitue un nouveau projet de recherche. Pour ma part j'ai participé aux investigations portant sur la première question.

Le premier objectif de cette seconde partie était de donc de mesurer pour la première fois la $[Mg^{2^+}]_i$ dans des cellules exprimant un CFTR. Pour cela, nous avons choisi le CFTR-WT et deux mutants : le CFTR-F508del et le CFTR-G551D.

Si une différence de $[Mg^{2+}]_i$ était constatée, deux questions se poseraient. Quelle peut être l'origine de cette différence et quel serait son impact sur la fonction du CFTR ?

RESULTATS

I. Partie 1 : ATF6 dans la mucoviscidose

Introduction

Le premier objectif de cette thèse était de mesurer l'impact de l'inhibition chimique d'ATF6 sur l'expression et la fonction du CFTR-F508del. Ce canal protéique est altéré à la suite de la mutation F508del du gène *cftr*, mutation la plus fréquente chez les personnes atteintes de la mucoviscidose.

Le CFTR-F508del est mal replié et retenu par le système de contrôle qualité du RE et dégradé par le protéasome. Plusieurs études ont montré que l'UPR et plus particulièrement la voie ATF6 étaient activées dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. De plus, ATF6 réprime transcriptionnellement le CFTR.

L'inhibiteur choisi pour répondre à cette problématique est le fluorure de 4-(2aminoéthyl)benzènesulfonyle (AEBSF). Cet inhibiteur non spécifique d'ATF6 agit en inhibant son clivage par S1P, empêchant ainsi son activation.

Résultats

Le premier point était de valider l'induction de l'UPR et de la voie ATF6 dans notre modèle cellulaire, des lignées cellulaires *cystic fibrosis bronchial epithelial* (CFBE). Pour ce faire, nous avons mesuré par Western blot l'expression de BiP (marqueur principal du déclenchement de l'UPR), de la forme totale d'ATF6 (ATF6-90 kDa) et de sa forme active (ATF6-50 kDa). Les trois protéines ont montré une expression significativement augmentée dans les CFBE-F508del, prouvant l'activation de l'UPR et de la voie ATF6 dans ces cellules.

Afin de déterminer les conditions optimales d'utilisation de l'AEBSF, nous avons ensuite mesuré l'expression de ces trois protéines à différents temps après traitement des cellules avec cet inhibiteur. Les résultats obtenus indiquent une diminution significative de l'expression d'ATF6-50 kDa après une heure de traitement. Quatre heures de traitement sont nécessaires pour diminuer significativement l'expression de BiP. Les résultats sont plus mitigés pour ATF6-90 kDa.

Après avoir choisi un temps de traitement, nous avons évalué l'impact de ce traitement sur la fonction du CFTR-F508del par *whole patch-clamp*, puis sur son expression à la membrane par immunoprécipitation membranaire. Les résultats ont montré une augmentation significative des courants Cl⁻ et de la présence du CFTR entièrement glycosylé à la membrane après un traitement des cellules exprimant un CFTR-F508del avec l'AEBSF.

Enfin, par électrophorèse bi-dimensionnelle (2D) couplée à la spectrométrie de masse, nous avons isolé et identifié six protéines dont l'expression varie significativement à la suite du traitement. Ces protéines sont principalement des protéines chaperons résidentes du RE impliquées dans le repliement des protéines.

Discussion

Tout d'abord, nos résultats confirment la participation d'ATF6 dans les processus de rétention du CFTR-F508del dans le RE.

Ensuite, les résultats obtenus ouvrent de nouvelles voies quant à l'utilisation de modulateurs d'ATF6, ou de l'UPR en général, dans la mucoviscidose mais également dans d'autres pathologies.

Inhibition of ATF6-mediated Unfolded Protein Response improves F508del-CFTR's function in Cystic Fibrosis Cells

Florentin Huguet^{1,2,3}, Mathieu Kerbiriou^{1,2*}, Marie-Laure Calvez^{1,3}, Nathalie Benz^{1,3}, Claude Férec^{1,2,4,5}, Pascal Trouvé^{1*}

¹ Inserm, UMR 1078, Brest, F-29218, France

² Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine et des sciences de la santé, Brest, F-29200, France

³ Association Gaétan Saleün, Brest, F-29218, France,

⁴ CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Brest, F-29200, France

⁵ Etablissement Français du Sang - Bretagne, Brest, F-29200, France

* Corresponding authors

Pascal Trouvé (<u>pascal.trouve@univ-brest.fr</u>) Mathieu Kerbiriou (<u>mathieu.kerbiriou@univ-brest.fr</u>) Inserm UMR 1078, Génétique, Génomique Fonctionnelle et Biotechnologies, 46 rue Félix Le Dantec, 29218 Brest, France Tel.: +33 (0)2 98 22 36 79

Acknowledgements

This work was partly supported by the French foundations "Vaincre La Mucoviscidose" and "Gaétan Saleün". We would like to thank the PurIProB core facility (Inserm UMR1078, Brest, France) for its technical support.

Abstract

Activating transcription factor 6 (ATF6) is an endoplasmic reticulum (ER) transmembrane protein involved in the Unfolded Protein Response (UPR) which is activated during ER stress caused by an accumulation of misfolded proteins in the ER. In cystic fibrosis (CF), the retention of the F508del-mutated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein within the ER, triggers UPR which negatively regulates the expression of CFTR. ATF6 is involved in CFTR repression and understanding this inhibitory mechanism is of great interest to develop a therapeutic approach based on UPR regulation. Using the serine protease inhibitor 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) we investigated the impact of ATF6 inhibition on both function of F508del-CFTR and membrane localization. First, using immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP) and ATF6 as UPR markers, we showed that F508del-CFTR expression triggers the UPR in CFBE41o-/F508del cells. Then, we observed the inhibitory effect of AEBSF on UPR due to an inhibition of the ATF6 pathway, in CFBE410-/F508del treated cells. Moreover, we showed that both membrane localization and function of F508del-CFTR are partially restored when ATF6 activation is impaired by AEBSF. In conclusion, our data demonstrate the altered function and membrane localization of F508del-CFTR can be restored by the inhibition of ATF6. Our results were further confirmed using a specific S1P inhibitor (PF-429242). Therefore, we propose that the inhibition of the UPR's sensor ATF6, as well as the inhibition of its cleavage, is a potential target for the treatment for CF patients expressing the F508del mutation.

Keywords: cystic fibrosis; CFTR; F508del-CFTR; Unfolded Protein Response; ATF6

Abbreviations: 2-ME, 2-mercaptoethanol; ABC, ATP-binding cassette; AEBSF, 4-(2aminoethyl)benzenesulfonylfluoride; ATF4, activating transcription factor 4; ATF6, activating transcription factor 6; ATP, adenosine triphopsphate; Bip, immunoglobulin heavy chain-binding protein; BSA, bovine serum albumin; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CF, cystic fibrosis; CFTR, CF transmembrane conductance regulator; CHOP, CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; CI⁻, chloride; eIF2α, alpha subunit of the eucaryotic initiation factor 2; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; ERQC, ER quality control; ERSE, ER stress response element; G3PDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GRP78, glucose regulated protein of 78 kDa; HRP, horseradish peroxidise; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; NF-kB, nuclear factor-kappa B; PBS, phosphate buffer saline; PERK, protein kinase RNA-like ER kinase; S1P, site-1 protease; S2P, site-2 protease; SEM, standard error of the mean; TBST, Tris-buffered saline with Tween 20; UPR, unfolded protein response; UPRE, UPR response element; WT, wildtype.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common inherited lethal genetic disease in the Caucasian population. This autosomal recessive disease is caused by mutations in the *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (*CFTR*) gene [1]. To date, more than 2,009 mutations have been identified in the *CFTR* gene resulting in expression and/or function defects of the CFTR protein (http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html). The CFTR protein belongs to the adenosine triphopsphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporters' family and has several functions. It mainly acts as a chloride (CI') channel regulated by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and participates in ion exchange at the apical membrane of epithelial cells [2, 3]. In CF patients, the CFTR malfunction causes a defect in the CI[°] secretion via CFTR, which leads to the thickening of the secreted mucus and promotes infections and inflammation.

In eukaryotic cells the endoplasmic reticulum (ER) is an organelle involved in the synthesis and assembly of membrane and secreted proteins [4]. These processes are tightly controlled by the ER quality control (ERQC) system to ensure the proper conformation and function of proteins [5, 6]. This system is especially important because an accumulation of malformed proteins in the ER lumen, which could result of several disruptions in ER homeostasis, represents a threat to the cell called ER stress [7]. If that occurs, in order to cope with this stress, the cell triggers a series of physiological signalling and transcription events increasing ER refolding abilities, maturation and degradation (synthesis of chaperones, etc.) known as unfolded protein response (UPR) [8-10].

The UPR is a normal physiological process which tends to restore ER homeostasis and consists of the transcription activation of target genes encoding ER chaperones residents, proteins of glycosylation, proteins of the secretory pathway and constituents of the ER-associated degradation (ERAD) system [11-16]. In mammals, the UPR moreover allows a fast and intense repression of protein synthesis which limits the entry of new proteins in the ER and therefore avoids overloading it [17, 18]. The UPR, which is also triggered during inflammatory and infectious processes [19-22], can also induce apoptosis when the stress is too intense or continues in the cell [23, 24].

The main sensor and regulator of this response, the molecular chaperone immunoglobulin heavy chain-binding protein/glucose regulated protein of 78 kDa (BiP/GRP78) [25-28], detects the ER stress. In addition, three ER membrane proteins are able to detect the protein assembly status in the ER lumen and convey this information to two

primary effectors systems: ER stress response element (ERSE) and UPR response element (UPRE) [29]. These are the protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) [30], inositol-requiring enzyme 1 (IRE1 α/β) [31] and activating transcription factor 6 (isoforms α and β) [32], which define the three axes of the UPR in mammals: a PERK induced translational pathway and two transcriptional pathways composed of IRE1 and ATF6 [33]. In unstressed cells, PERK, IRE1 and ATF6 are associated with BiP and maintained in an inactive state [34, 35]. During cellular stress, misfolded proteins accumulate in the ER lumen and bind to BiP, causing the release and activation of the three other actors of the UPR which initiates adaptive responses [36-38]. Note that by its interactions with PERK, IRE1 and ATF6, the heat shock protein BiP is considered as the main regulator of the UPR and is commonly used as an ER stress marker [39, 40].

In CF the most common mutation (around 80% of patients) corresponds to the expression of the F508del-CFTR protein which is misfolded and retained in the ER [41]. Several studies showed that this retention triggers the UPR [42-44]. Interestingly, ER stress and the UPR are involved in inflammation, which is characteristic of CF, notably by activating the nuclear factor-kappa B (NF-kB) [45-50] which itself has the capacity to trigger response pathways related to ER stress [19, 20]. Besides, it was shown that the F508del-CFTR expression and its accumulation in the ER contribute to NF-kB activation and to the inflammatory signalling [51]. In addition, the UPR is activated during infectious processes, also characteristic of CF [21, 22]. Indeed, CF patients suffer from chronic infections stimulating defence mechanisms. This led to the development of an exacerbated inflammatory response involved in tissue degradation, particularly in the lungs, and eventually leads to respiratory failure, the leading cause of death in CF patients. These studies highlight the relevance to work on the UPR in CF and underline the fact that finding strategies to regulate the UPR and restore ER homeostasis could represent a therapeutic approach for CF patients.

Interestingly, different studies showed that ATF6, one of the three sensors of the UPR, negatively regulates CFTR expression at both mRNA and protein level, making ATF6 a potential therapeutic target for CF [42, 52, 53]. To act as a transcriptional activator on UPR genes ATF6 has first to be activated. After dissociation from BiP, full length ATF6 (90 kDa) migrates to the Golgi [35, 36, 54] where it is sequentially cleaved by Site-1 and Site-2 proteases (S1P and S2P) [55-57]. Then the cleaved and active form of 50 kDa acts in the nucleus where it binds to ERSE and UPRE located in the promoters of UPR target genes thereby inducing transcription of a network of genes [10, 58-62]. It includes genes encoding

ER chaperones (like *HSPA5*) and *XBP1* which could also be induced by IRE1 and enhances the transcription of UPR genes involved in protein quality control, disulfide linkage, ERAD and lipid synthesis [10, 63, 64]. ATF6 could also induce apoptosis through CCAAT/enhancerbinding protein homologous protein (CHOP) transcriptional induction [65, 66], even if the activation of activating transcription factor 4 (ATF4), which is induced by the PERK mediated phosphorylation of the alpha subunit of the eucaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) (decreasing the overall protein synthesis), is thought to play a dominant role in the induction of CHOP in response to ER stress [67].

The present work is based on the results showing the inhibitory effect of the UPR effector ATF6 on both expression and function of CFTR. Our goal was to clarify the mechanism of CFTR inhibition by ATF6 in the CF cell model CFBE410- [42, 52, 53]. ATF6 is indeed a key component in the regulation of CFTR expression under stress conditions and its inhibition would represent a potential therapeutic target for CF, as confirmed by the results showing a partial restoration of the F508del-CFTR channel activity when ATF6 is reduced [42].

To study the ATF6 pathway of the UPR and its impact on CFTR function in a CF cells model, a pharmacological manipulation to this specific branch of the UPR was utilized. Thus we used the serine protease inhibitor 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) (also known as Pefabloc SC) to inhibit S1P and thus the ATF6 pathway of the UPR [68, 69]. In the present study we have shown that AEBSF improves F508del-CFTR function in CF cells. Furthermore, results in this study show that this partial restoration of the F508del-CFTR activity is explained by an increased expression of the mature form of CFTR in the membrane of the cells. Therefore, the inhibition of ATF6 in CF stressed cells could represent a potential treatment for CF patients expressing the F508del-CFTR. We also showed using a proteomic approach, that the rescue of F508del-CFTR is accompanied and explained by the modulation of the expression of proteins implicated in mRNA maturation and splicing (HNRNPH1, HNRH3) and involved in the folding and the degradation of F508del-CFTR (PDIA3, HSP7C, GRP75 and HSP71), in link to UBC which is a CFTR modifier gene.

Materials and methods

Cell culture and regents

The CFBE41o- cells purchased from Professor D.C. Gruenert (San Francisco, CA, U.S.A.) were human bronchial epithelial cells endogenously expressing the F508del-CFTR

antibody (H-300) (#SC-20757, SantaCruz Biotechnology), Rabbit polyclonal anti-GRP78 antibody (H-129) (#SC-13968, SantaCruz Biotechnology). Membranes were further incubated 1h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody diluted in PBST (1/20,000): Goat anti-rabbit (#A0545, Servilab). Blots were developed by enhanced chemiluminescence kit (ECL Plus, GE Healthcare) and analyzed using Chemi-Smart 5100 ECL imaging system (Vilber Lourmat). The relative intensity of each band was quantified by densitometry using BIO-1D software (Vilber Lourmat). Each value was normalized by blue coomassie staining or the G3PDH signal obtained in the same lane on the same blot probed with mouse monoclonal antibody anti-G3PDH (#H86504M, Meridian Life Science[®], Inc.) diluted in PBST (1/30,000).

Patch-clamp experiments

Whole-cell patch-clamp recordings were obtained with the patch clamp system Port-a-Patch[®] (Nanion Technologies GmbH, Germany) as previously described [74, 75]. Untreated or AEBSF treated cells were incubated with the external solution (140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 5 mM D-glucose monohydrate, pH 7.4, 298 mOsmol) before recording. The internal solution used was 50 mM CsCl, 10 mM NaCl, 60 mM Cs-Fluoride, 20 mM EGTA, 10 mM Hepes/CsOH, and 5 mM Mg-ATP (Mg salt); pH 7.2; 285 mOsmol. CFTR activation and CFTR inhibition was done using the CFTR-activator (10 mM forskolin and 30 mM genistein both from Sigma) and the CFTR-inhibitor (10 mM CFTRinh172, Sigma) solution respectively, that were added to the external solution. Voltage steps (100 ms) from a holding potential of - 80 mV, from -80mV to +80 mV (10 mV increments) were applied. Data were captured using the Patchmaster program (Nanion Technologies GmbH, Germany) and currents normalized by membrane capacitances to remove variability due to differences in the cell sizes. Results were presented as graphic representations of I/V relationship and as bar graphs after statistical analysis of the normalized values, at +80mV.

Cell surface detection of CFTR

BHK cells stably expressing WT-CFTR or F508del-CFTR were graciously given by Dr. John W. Hanrahan (McGill University). A 3-Haemaglutinin (HA)-epitope tag was inserted in the fourth extracellular loop of CFTR in these cell lines [76]. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Lonza, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were washed three times with cold 1X PBS (Eurobio, France) plus bovine serum albumine (BSA, 0,5%) and incubated 1h at 4°C with an anti-HA antibody

obtained from a CF patient homozygous for the F508del mutation [51,52]. The cells used in experiments were the transduced CFBE41o-/WT also called CFBE41o-/corrected (CFBE41o-/corr) and CFBE41o-/F508del cells, and were cultured as previously described [53]. These cells will be also called cells expressing Wt-CFTR and cells expressing F508del-CFTR in the manuscript. Cell culture media and supplements were purchased from Lonza (Basel, Switzerland) and CliniSciences (Nanterre, France). To inhibit ATF6 activation, cells were incubated with 300µM of the serine protease inhibitor 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) purchased from Servilab. In some experiments, ATF6 activation was blocked by the use of 10µM PF-429242 (4-[(Diethylamino)methyl]-N-[2-(2-methoxyphenyl)ethyl]-N-(3R)-3-pyrrolidinylbenzamide, from Tocris)

Immunoblotting

Untreated or AEBSF treated cells were rinsed twice with cold PBS. For total cell lysate preparation, cells were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Na-Deoxycholate, 0.1 % SDS, 10 mM iodoacetamide, 100 µM PMSF) supplemented with fresh protease-inhibitor cocktail (Complete tablets - EDTA free, Roche, Basel, Switzerland) added extemporaneously at a final concentration of 40 μ l/ml (30 min on ice). Lysates were centrifugated (15 min, 16000g, 4°C). For nuclear preparation, cells were washed twice with cold PBS, and lysed with buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 2mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.20 % NP40 and protease-inhibitor cocktail) during 15 min at 4°C. Lysates were then centrifuged (1,500×g, 2 min, 4°C) and the supernatants (cytosolic fraction) were removed in a new tube. The pellet was washed twice in buffer B (Buffer A without NP40) and lysed with buffer C (20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂ 450 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 25 % Glycerol and protease-inhibitor cocktail) during 1h vortexing 2200 rpm. Lysates were then centrifuged (14,000xg, 10 min, 4°C) and supernatant (nuclear fraction) was removed in a new tube. Protein concentrations were determined using Lowry's methodology with the bovine serum albumin used as a standard [54].

For each sample equal amount of total or nuclear proteins was loaded on a polyacrylamide gel and resolved by SDS-PAGE (10 %). Samples were then transferred onto a PVDF membrane (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts, United States). After blotting, membranes were blocked with 5 % (w/v) non-fat dried skimmed milk in PBS-0.1 %Tween20 (PBST). Blots were then probed overnight at 4°C with the primary antibodies listed hereafter: Rabbit polyclonal anti-ATF6 antibody (#09-069, EMD Millipore), Rabbit polyclonal anti-S1P

(BioLegend, USA) diluted (1/250) in 1X PBS plus 0,5% BSA. Cells were washed three times with cold 1X PBS, scraped and centrifugated (300xg, 3min, 4°C). Cells pellets were suspended in RIPA buffer for 30 min on ice, centrifuged (16000xg, 15min, 4°C) and total protein concentration of supernatant was determined using Lowry's method, using BSA as a standard. Protein G magnetic beads (Thermo Fisher Scientific, USA) were equilibrated with cold RIPA buffer. Lysates were then incubated with the magnetic beads (100µl of magnetic beads per mg of total protein) at 4°C during for 2h. Beads were then rinsed three times in cold RIPA buffer and proteins were eluted with 2X sample buffer containing 2-mercaptoethanol (20min, 37°C). Finally, eluates were subjected to SDS/PAGE (7,5%) and transfered onto a PVDF membrane. Membrane was blocked with 5% (w/v) dried skimmed milk in PBS (0.1 %) with Tween20, probed overnight at 4°C with the anti-HA antibody (1/500) in 5% non-fat dried milk in PBST. Membranes were further washed and incubated 1h at RT with HRP conjugated anti-mouse antibody (1/20000; Santa Cruz Biotechnology, USA). Blots were developed by enhanced chemiluminescence kit (ECL Plus, GE Healthcare, USA) and analyzed using Chemi-Smart 5100 ECL imaging system (Vilber Lourmat, Germany).

Two-dimensional Gel Electrophoresis (2-DE) and Mass Spectrometry

100 µg of total proteins from untreated or AEBSF treated cells were used for experiments. Each protein sample was first diluted in DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) which contains optimized concentrations of urea, thiourea, CHAPS, DeStreak Reagent and appropriate IPG buffer. Passive rehydration of Immobiline DryStrip gels (7 cm, pH 3-10 NL, GE Healthcare) with samples was performed during 8 hours. Once rehydration completed, Immobiline DryStrip gel are transferred in the Manifold on Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) for first dimension isoelectric focusing (IEF). IEF protocol used is divided in five steps: 1- Step 300 V, 200 Vhr; 2- Grad 1000 V, 300 Vhr; 3-Grad 5000 V, 4500 Vhr ; 4- Step 5000V, 9000 Vhr ; 5- Step 300V, 12-15 h. Seconddimension separation is performed immediately after IEF is completed. Immobiline DryStrip gels are equilibrated (15 min at room temperature) in two SDS equilibration buffers (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH=8.8, 30 % Glycerol, 2 % SDS, 0.0002 % bromophenol blue + DTT or iodoacetamide) before SDS-PAGE. Electrophoresis was performed with lab-cast gels (1 mm, Bis-Tris 10 %) in 1X Tris-Glycine-SDS buffer (BioRad, Hercules, California, USA) at 120 V for 2h30. The 2-DE gels were stained with a G-250 Coomassie blue solution, scanned and finally digitalized using the GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). Gel alignment,

spot detection and quantification were done using the PDQuest software (PDQuest Basic-8.0.1, BioRad). Data are the means of 4 gels from 4 different experiments.

MS analysis of the differentially expressed proteins was performed at the « Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud Ouest, France » facility, using LC-MS/MS. Enzymatic digestion was realised by 50ng Trypsin (enzyme/protein ratio: 1/50, 37°C, overnight). Supernatant was used for extraction. LC-MS/MS analysis was done using a LTQ-Orbitrap Spectrometer. Nano HPLC (Dionex RSLC UltiMate3000) was used, followed by MS (Scan range: 400-1500 m/z, fragmentation: CID, Energy of collision: 35 %, Cycle for fragmentation (TopN): Top8). Data were converted to mzXML using MS convert (ProteoWizard v 3.0.8934). Databases interrogation was performed by X!Tandem Piledriver (v2015.04.01.1) and X!Tandem Pipeline (v $3.4.2 \ll$ Elastine Durcie \gg).

Protein-Protein Interactions (PPI) analysis

PPI networks were searched using STRING 10.0 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes and Proteins, http://string-db.org/). The protein's names were used as an initial input. The search parameters were as following: all PPI prediction methods were enabled, except for High-throughput Lab Experiments; maximum of 5 interactions by node; cut-off criterion of combined score ≥ 0.9 (highest confidence permitted in STRING); Homo sapiens.

Statistics

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between experimental groups were evaluated by a two-tailed unpaired Student's t test and were considered statistically significant when p<0.05 (*); p<0.01 (**) and p<0.001 (***).

Results

F508del-CFTR triggers UPR in CFBE41o-/F508del cells

Because BiP is the main sensor and regulator of the UPR [25-28], we used it as a reporter of UPR triggering. The expression of BiP in total cell lysates of CFBE41o-/WT and CFBE41o-/F508del cells was measured by western blot (Fig. 1A, upper panel). The comparison of BiP expression between these cells expressing either Wt-CFTR or F508del-CFTR, showed that BiP was significantly overexpressed in CFBE41o-/F508del cells (Fig. 1B). Thus our results show that the UPR is activated in cells expressing F508del-CFTR, in accordance with our previous results [42]. We also assessed full length ATF6 (90kDa) expression in total cell lysates of CFBE41o-/WT or CFBE41o-/F508del cells by western blot

(Fig. 1A, middle panel). We measured its expression level in both cell types and found that full length ATF6 expression was significantly higher in cells expressing F508del-CFTR than in Wt-CFTR cells (Fig. 1B). During UPR process, ATF6 is cleaved and its active form (50kDa) is released and translocated to the nucleus. Therefore, the cleaved form of ATF6 and its translocation to the nucleus were analyzed. Cytoplasmic and nuclear fractions of Wt-CFTR and F508del-CFTR cells were prepared and ATF6 expression was measured in the nuclear fractions by western blot (Fig. 1, lower panel). We found that the expression of the cleaved form of ATF6 was significantly increased in the nucleus of cells expressing F508del-CFTR (Fig. 1B), which is another evidence of the UPR activation in F508del-CFTR cells.

Therefore, as previously described [42, 43, 46], we found that UPR is triggered in cells expressing the F508del-CFTR protein.

ATF6 inhibition represses UPR in CFBE41o-/F508del cells

UPR triggering in cells expressing F508del-CFTR being shown, we assessed the effect of an AEBSF treatment upon UPR and ATF6. First of all, we defined the best conditions to use this serine protease inhibitor AEBSF for our experiments (not shown) and performed a 1 hour pre-treatment of the cells with 300 μ M AEBSF to evaluate its effects on the UPR and ATF6. As described above, we analyzed UPR by measuring the expression of BiP and evaluated both expression and activation of ATF6.

We measured BiP expression by western blot in total cell lysates of untreated or AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR (Fig. 2A). Untreated cells showed no significant variation of BiP expression over time (Fig. 2A, upper panel). In the presence of AEBSF, a significant decrease of BiP expression was observed after 4 hours of treatment (Fig. 2A, lower panel). The comparison of BiP expression between untreated and AEBSF treated cells, for each time point, was performed. Significant decreases at the 4 and 8 hours time points in the presence of AEBSF were observed (Fig. 2B). Therefore, these results demonstrated an inhibitory effect of AEBSF upon BiP expression in UPR activated F508del-CFTR cells. AEBSF is thus a repressor of the UPR in these cells. The expression of full length ATF6 was evaluated by western blot in total cell lysates of untreated or AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR. As observed in Fig. 3A (upper panel), no significant difference of ATF6 expression over time in untreated cells was observed after 4 and 8 hours of treatment, when compared to the zero time point (Fig. 3A (lower panel) and Fig. 3B). Moreover, the comparison between untreated and AEBSF treated cells for each time point

was done and showed significant decreases after 0.5, 1 and to 2 hours and a significant increase after 8 hours in AEBSF pre-treated cells (Fig. 3B). We further estimated ATF6 activation by assessing its presence in nuclear fractions of untreated and AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR (Fig. 4). In untreated cells we detected the cleaved form of ATF6 in the nuclear fractions (Fig. 4, upper panel). These experiments showed no significant variation of ATF6 expression over time (Fig. 4B). We further studied ATF6 activation in AEBSF treated cells and we observed significant decreases at the 2 and 4 hours treatment, when compared to the zero time point (Fig. 4A (lower panel) and Fig. 4B). Finally, we performed the comparison between untreated and AEBSF treated cells for each time point and observed significant decreased expression of the 50kDa form of ATF6, from 1 to 8 hours, in the nuclear fraction of AEBSF treated cells (Fig. 4B). Thus, our results showed that AEBSF inhibits ATF6 activation in cells expressing F508del-CFTR. Since ATF6 activation is due to a cleavage by S1P, we analyzed S1P expression in cells expressing Wt-CFTR and in cells expressing F508del-CFTR (Fig. 5A). We measured basal expression of S1P in total cell lysates from both cells types by western blot (Fig. 5A, left panel). No significant difference in S1P expression in cells expressing either Wt-CFTR or F508del-CFTR was observed (Fig. 5A, right panel). S1P expression was measured by western blot in total cell lysates of untreated and AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR (Fig. 5B). Experiments performed with untreated cells showed no significant difference during time (Fig. 5B, upper panel). The cells expressing F508del-CFTR were then submitted to the AEBSF treatment. As shown in Fig. 5B, no significant variation was observed over time except for the 2 hours time point (Fig. 5B, bar graphs). Finally, the comparison of S1P expression between untreated and AEBSF treated cells for each time point showed no significant difference (Fig. 5B).

ATF6 inhibition by AEBSF partially restores the Cl channel function of F508del-CFTR

To appreciate the effect of ATF6 inhibition by AEBSF on CFTR Cl⁻ channel function we performed patch-clamp experiments, in the whole cell configuration, on untreated or AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR (Fig. 6). The used experimental conditions were previously described [75, 77]. CFTR activators and inhibitor [75, 77] were used for patch-clamp experiments and were efficient to stimulate or inhibit the CFTR Cl⁻ channel activity, respectively, showing the specificity of the recorded signals (data not shown). We first compared the CFTR's function between cells expressing Wt-CFTR and cells expressing F508del-CFTR. Corresponding I/V curves are shown in Fig. 6A. Four to six independent experiments were realized from different cell cultures and the statistical analysis showed that the mean cell CI⁻ currents in CFBE410-/WT cells (118,8±21,09 pA/pF) were significantly higher than those recorded in CFBE410-/ F508del cells (32,98±14,71 pA/pF) (Fig. 6B). Unsurprisingly, our results confirmed the altered CI⁻ channel activity of the F508del mutated CFTR in CFBE/F508del cells. Then we analysed the impact of an 8 hours AEBSF treatment on F508del-CFTR CI⁻ channel activity (Fig 6A). This time point was chosen because at this time point, all our UPR markers indicated that AEBSF inhibits UPR. Four independent experiments were performed with AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR. A significant increase of the mean cell CI⁻ currents in AEBSF treated cells (83,42±11,51 pA/pF), compared to CF untreated cells (32,98±14,71 pA/pF) was observed (Fig. 6B). Therefore, our results showed that AEBSF induced a 2.5 fold increase of the F508del-CFTR 'S CI⁻ function, reaching the limit of significance of the Wt-CFTR CI⁻ function (118,8±21,09 pA/pF). Therefore, our results show the partial restoration of the F508del-CFTR CI⁻ function in CFBE/F508del cells treated with AEBSF and suggested that using AEBSF to inhibit the ATF6 branch of the UPR in CF cells could represent a potential treatment for CF patients expressing the F508del-CFTR mutated protein.

We found that AEBSF inhibits ER stress-induced proteolysis of ATF6 and restores the Cl⁻ channel function of F508del-CFTR. Because of the importance of these results, we assessed the effect of another S1P inhibitor. Indeed, the observed recovery of the function of F508del-CFTR could be due to AEBSF itself. We used a specific S1P inhibitor, the amino-pyrrolidine amide compound PF-429242, which efficiently blocks the S1P-mediated cleavage of ATF6 upon ER stress [78]. The effect of PF-429242 upon F508del-CFTR function was assessed using the same methodology as for AEBSF. I/V curves were drawn (Fig. 7A). It was observed that the Cl⁻ currents through F508del-CFTR were higher in PF-429242 treated cells (n=6) than in untreated cells (n=5). The statistical analysis (Fig. 7B) showed that PF-429242 treatment leads to a significant increased function of F508del-CFTR (82,67±22,26 pA/pF) and that this increased function is similar to the increase observed with AEBSF.

Cell surface expression of F508del-CFTR is increased when ATF6 is inhibited

To explain the partial restoration of the Cl⁻ channel function of F508del-CFTR when ATF6 is inhibited by AEBSF, we assessed the rescue of CFTR within cell membranes. We used BHK Chinese hamster ovary cells because they are not polarized and therefore CFTR's function can be studied independently of sophisticated trafficking and regulation [79]. Despite they are less relevant regarding CFTR biogenesis, they represent a simple model and when they are transfected they express high amounts of CFTR. This permits a more direct

characterization of a direct effect of a compound upon CFTR function. The used BHK cells did express CFTR with a 3-Haemaglutinin (HA)-epitope tag on the fourth extracellular loop [76]. The tag was recognized by an anti-HA antibody which was directly added to the culture medium and recovered by magnetic beads and detected by immunoblot. As shown in Fig. 8, the mature form of CFTR (C band, 170 kDa) was observed in the cells expressing Wt-CFTR and was absent in F508del-CFTR cells. In cells expressing F508del-CFTR, the mature form of CFTR was only observed after AEBSF treatment, indicating that ATF6 inhibition induces the glycosylation of F508del-CFTR and likely its exportation to the membrane.

Differentially expressed proteins when ATF6 is inhibited

In order to depict differentially expressed proteins after ATF6 inhibition, cell lysates of untreated and treated cells were submitted to 2-DE. 4 gels were performed with both cell types and spots were analyzed by PDQuest software (BioRad). 404 and 408 spots were detected in untreated and treated cell lysates, respectively (Fig. 9). Among spots showing variations in their expression and according to the parameters used for the detection, 4 spots were increased (above 2 fold) in untreated cells (Fig. 9, upper panel) and 4 spots were increased in cells with inhibited ATF6 (Fig. 9, lower panel). These 8 spots were further analyzed by MS. This analysis led to the identification of 6 different proteins (Table 1). HNRNPH1 and HNRH3 were found to be decreased whereas, PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 were found to be increased, after ATF6 inhibition (Table 1).

PPI networks of the differentially expressed proteins when ATF6 is inhibited

For a better description of the depicted proteins, we search for their potential interactions using the 10.0 version of STRING [80]. We used the basic interaction unit in STRING for functional association between proteins, derived from known experimental data. For HNRNPH1, HNRH3, PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 we searched for high confidence (≥ 0.9) interactions and retrieved independent graphs. Unexpectedly, we observed that the proteins shared Ubiquitin C (UBC) as a common interacting partner and we drew a global graph showing this interaction (Fig. 10). We also observed that HSP7C and HSP71 directly interact with CFTR.

Discussion

The most common genetic form of CF is due to the F508del mutation in the *CFTR* gene. This mutation leads to an incorrectly folded CFTR protein which is retained in the ER and partially degraded. This accumulation of unfolded F508del-CFTR protein in the ER

triggers the UPR adaptive response [42, 43, 52]. To cope with unfolded proteins accumulated in the ER, cells transiently diminish their translational and transcriptional activity. In parallel they activate genes encoding ER-resident chaperones such as BiP and folding enzymes, with the aim of increasing the folding capacity of the ER. The UPR transducer ATF6 and ER stress sensor BiP are widely used as UPR markers [40, 80]. ATF6 is a type II transmembrane glycoprotein anchored in the ER which is activated by proteolysis by S1P in response to ER stress [58, 69]. Indeed, its N-terminal part is then released from the membrane of the ER, is translocated to the nucleus where it activates the transcription of their target genes of the ERSE [58].

In 2007, we showed for the first time a specific involvement of ATF6 in cells expressing F508del-CFTR and we demonstrated that when ATF6 expression is decreased by siRNA, the Cl⁻ flux through F508del-CFTR are increased [42]. Therefore, the aim of the present work was to show that this effect can be achieved by the use of chemical compounds. The serine protease inhibitor 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) was shown to inhibit the proteolysis of ATF6, leading to the inhibition of the transcriptional of ATF6target genes [69]. This inhibited ATF6 activation was further shown to be due to a direct S1P inhibition [69]. Therefore, we used AEBSF to treat cells expressing Wt-CFTR and F508del-CFTR. No obvious cell toxicity was observed in the used concentration. We assessed the effect of the compound on BiP and S1P expression, and upon ATF6 expression. We observed an effective UPR inhibition which was further correlated to an increased function of F508del-CFTR in treated cells, in link with a higher amount of the mutated protein within membranes. To further confirm this finding regarding the effect of the S1P blockage upon CFTR, we used another compound know to inhibit S1P. This compound was PF-429242 which, beside its anti-viral activity, is known to inhibit the processing of the activation of ATF6 in response to ER stress [78]. As for AEBSF, no obvious cell toxicity was observed.

Having shown that AEBSF reduced the expression of the cleaved form of ATF6 and decreases S1P expression, we tested the effect of both AEBSF and PF-429242upon F508del-CFTR's function, using whole cell patch-clamp experiments [77]. For both compounds we showed increased Cl⁻ efflux in cells expressing F508del-CFTR. This increased F508del-CFTR's function could be explained by an increased expression, an increased translocation towards the membrane, a decreased degradation by ERAD, a decreased recycling or by an increased time of presence and thus membrane localization of the channel. We did not test experimentally all these hypotheses but assessed a potential increased localization of F508del-

CFTR within membranes, after treatment. Our results showed that AEBSF and PF-429242 both increase the presence of F508del-CFTR within membranes. Indeed, the appearance after treatment of the cells, of the 170 kDa form of CFTR, which is fully glycosylated, likely indicated that the localization of the protein was increased in membranes or that its maturation was increased (or both). Nevertheless, other hypotheses were not excluded.

In order to depict the molecular action linking AEBSF to the increased Cl⁻ function of F508del-CFTR, we performed 2-DE and MS analysis of differentially expressed proteins after treatment. We found that HNRNPH1 and HNRH3 were decreased and that PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 were increased, when the cleavage of ATF6 is inhibited. We further performed a bibliographic analysis to characterise these proteins. A summary of their function and possible involvement in CF is given Table2.

From transcription in the nucleus to the cytoplasm, mRNAs associate with proteins (RNA-binding proteins). These interactions with ribonucleoproteins (RNPs) are involved in pre-mRNA processing, transport, localization, translation and stability of mRNAs. Among RNPs, heterogeneous nuclear RNPs (hnRNPs) are proteins that bind to nascent transcripts produced by RNA polymerase II (for review [82]). A specific feature of the hnRNPs is that they undergo nucleocytoplasmic shuttling and that their function involves interactions within many other proteins [82, 83]. The H family of hnRNPs includes H1 (H), H2 (H') and H3 hnRNPs which have very similar sequences and which are well known regulators of alternative splicing [84]. Due to their involvement in the regulation of gene expression, hnRNPs have been linked to numerous diseases [85]. We found here that the expression of HNRNPH1 and HNRH3 is decreased in cells when ATF6 cleavage is inhibited. Therefore, a modulation of mRNA processing and alternative splicing may occur. Knowing that posttranscriptional processing of CFTR mRNA may be modulated, leading to an in-frame skipping of exon 9 [86], HNRNPH1 and HNRH3 are possibly involved in modulation of the expression of functional mRNA of F508del-CFTR. Indeed, whereas HNRNPH1 was shown to inhibit alternative splicing in neurons [87], HNRH3 was shown to shown to enhance RNA splicing and processing [88]. HNRNPH1 and HNRH3 are therefore involved in our treated cells but in view of the bibliography it is not clear if they can explain the observed Cl⁻ channel function of F508del-CFTR when ATF6 cleavage is inhibited. They can furthermore be implicated in the maturation of many mRNAs and have an indirect implication upon CFTR maturation and membrane targeting.

PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 were increased when ATF6 cleavage was inhibited.

The protein PDIA3 (Protein disulfide-isomerase A3, Grp58) belongs to the protein disulfide isomerase family, whose members are mainly present, in the ER [89] where it exhibits a stress-responsive protein function. As such, it was identified together with GRP78 and GRP94 with an increased expression after glucose depletion [90]. The main function of PDIA3 (Grp58) is to oxidize thiols and reduce disulfide bonds of proteins, in order to reshuffle improperly formed disulfide bonds and to correct the folding of proteins within the ER [91]. As a chaperone protein [91] and together with calnexin and calreticulin, it is involved in the correct folding of glycoproteins within the ER [92]. Therefore its increased expression after ATF6 inhibition likely favours the refolding of F508del-CFTR, explaining why we found an increased function and an increased amount of the mature form of CFTR in treated cells. Furthermore, PDIA3 was shown to be present in CFTR's protein complex and up-regulated when F508del-CFTR is chemically or genetically rescued [93]. This latest point indicates that we succeeded to rescue F508del-CFTR, as shown by the present results.

HSP71 (71 kDa heat shock protein, HspA1A/ HspA1B) belongs to the 70 kDa heat shock protein (HSP70s) family. It is found in cytosol, nucleus, membranes and in extracellular exosomes. It can be induces by stress such as thermal stress, infections, inflammation and oxidants [94]. To fulfill their numerous cellular and stress-induced functions, HSP70s bind ATP [95] and act as unfolding machines able to shift polypeptides to various folding states. When exposed to stressors, HSP70s bind misfolded proteins and prevent their aggregation [96]. Indeed, they HSP70s possess an unfoldase activity since they are able to recognize misfolded and aggregated proteins and to unfold them to a natively refoldable state [97]. Among HSP70s, HspA1A and HspA1B, which only differ by two amino acids, are the major stress-inducible HSP70s [94] with a pivotal role in the protein quality control system of misfolded proteins and in their targeting to degradation [98]. Regarding CFTR, Hsp70 are of main importance. They associate with both Wt-CFTR and F508del-CFTR and dissociate from Wt-CFTR when it is transported from the ER to the Golgi [99]. F508-CFTR/Hsp70 forms a stable complex permitting the degradation of F508del-CFTR in the pre-Golgi, nonlysosomal, compartments [99]. They are therefore involved in the maturation and in the degradation of unfolded CFTR such as F508del-CFTR. We observed an increased expression of the HSP71 member of HSP70s when ATF6 is inhibited. We thus hypothesize that this increased protein expression is eliminating unfoldable F508del-CFTR

and is favouring the maturation and refolding of some reversely unfolded F508del-CFTR. The ultimate effect is likely an increased refolding, as seen in the present results.

Among HSP70s, we also observed an increased expression of HSP7C (Hsc70; constitutive) which is also known as HspA8 [96]. HspA8 is a cognate Hsp70 family with essentially folding and transport of polypeptides across intracellular membranes as main functions [96]. Interestingly, stress maintains HSPA8 in a monomeric form leading to the release of unfolded proteins previously bound to it [100]. Indeed, HSPA8 has four main functions: 1) it binds native and misfolded proteins to favor their refolding [101], 2) it transports unfolded proteins through membranes to deliver them to their final localization [102], 3) it recruits proteins for proteasome activation [103], and 4) it brings proteins to the endosomes and triggers autophagy [104]. It forms a cytosolic complex together with CHIP E3 and cooperates with the ER membrane associated ubiquitin ligase complex to favour triage of proteins [105]. HSP7C, together with Hsp70, is involved in the proper folding of CFTR [105] by direct interactions with a higher affinity for F508del-CFTR than for Both Wt-CFTR [106]. Thus, it's over expression in the present work is in favour of a greater folding and exportation of F508del-CFTR to the membrane.

GRP75 (Glucose-regulated protein 75), also called mortalin (sometimes termed GRP75/mtHSP70/PBP74), is a member of the HSP70s family [107]. Mortalin is translated in the cytoplasm and is transported into mitochondria [108]. Neverheless, it is also found in the ER endoplasmic reticulum, and in the cytosol [109]. Mortalin is a stress response protein and its increased expression is associated with cellular protection, as it permits cells to survive lethal conditions [110, 111]. It has a broad panel of functions such as stress response, intracellular trafficking, cell differentiation and proliferation (for review [112]). Because it ensures the final localization of proteins, modifies their functions, protect them against stress and is up-regulated when F508del-CFTR is rescued [93, 113, 114], its overexpression when ATF6 is inhibited likely leads to the recovery of some mutated CFTR, explaining our present results.

The protein network in which a protein takes place is a good indicator of the pathway in which it is involved. Thus, we search for interacting proteins with PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP7, using STRING which is a global resource currently covering 9,643,763 proteins. In an unexpected way, we found that all the proteins that were found modulated when ATF6 is inhibited have a common partner: ubiquitin C (UBC). This result was further confirmed by the analysis of the relevant bibliography for each interaction (HNRNPH1-UBC,

[115]; HNRH3-UBC, [116]; PDIA3 (Grp58)-UBC, [117]; HSP7C- HSP71- and GRP75-UBC, [118]). Unfolded proteins in the ER are exported into the cytosol and degraded via the ubiquitin-proteasome pathway, a process termed ER-associated degradation (ERAD). Therefore, protein ubiquitination contributes to the regulation of protein degradation. As any protein, both Wt- and F508del-CFTR undergo ubiquitination and degradation [119]. Misfolding of F508del-CFTR facilitates its lysosomal targeting by promoting its ubiquitination [120]. Therefore, if UBC is overexpressed in our model, what we do not know, it would not explain the higher amount of F508del-CFTR in cell membranes when ATF6 is inhibited. Nevertheless, the promoter of the UBC gene (UBC) contains putative heat shock elements (HSEs) which mediate UBC induction upon stress. At least three HSEs, exist in the UBC promoter: two distal, and one proximal to the transcription start site, all bound by transcription factors belonging to the heat shock factor (HSF) family. The proximal is a negative regulator of the stress-induced transcription [121]. Therefore, if a HSE with a negative role on the transcription is overexpressed, it could explain why in our hands, more F508del-CFTR is present in the membrane. It has also to be noticed that we recently showed a pivotal role of UBC as a modifier gene in CF by in silico studies [122].

Conclusion

The two isoforms of ATF6 (ATF6 α and ATF6 β), are cleaved in response to ER stress. Their resulting N-terminal fragments possess a DNA binding domains. When translocated to the nucleus, they both bind to ER stress-response elements (ERSE). Nevertheless, it was shown that ATF6 β possesses very low specific transcriptional activity when compared with ATF6 α and is likely a repressor of ATF6 α [122, 123]. In other words, the relative levels of ATF6 α and ATF6 β , lead the strength and duration of ATF6 α dependent ERSE genes induction. In the present study, the cleavage of both ATF6 isoforms was inhibited. Indeed, under ER stress, the cleavage of ATF6 α was shown to be maximal after 3 to 4 h, whereas the cleaved form of ATF6 β appears after 8 h [122].

In CF, we showed that the inhibition of the cleavage of ATF6 by S1P alleviates the defects observed in the membrane localization and Cl⁻ channel function of F508del-CFTR. According to our proteomic study, this rescue is due to the modulation of the expression of proteins implicated in mRNA maturation and splicing (HNRNPH1, HNRH3) and in the folding and the degradation of F508del-CFTR (PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71). Our results are therefore in accordance with a previous work, in which ATF6a -/- cells were

submitted to ER stress [60]. Interestingly, all the proteins we highlighted in the present work can directly interact with UBC, which was reported as a CFTR modifier gene [124].

The present work shows the implication of ATF6 in F508del-CFTR biogenesis and constitutes the first proof of concept of ATF6 inhibition as a target in CF therapy.

References

1- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245:1066-1073

2- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. (1991) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. Science 253:202-205

3- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, Klinger KW, Smith AE, Welsh MJ. (1990) Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. Nature 347:358-363

4- Gething MJ, Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell. Nature 355:33-45

5- Araki K, Nagata K. (2012) Protein folding and quality control in the ER. Cold Spring Harb Perspect Biol 4:a015438

6- Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. (2014) Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. The Journal of cell biology 204:869-879

7- Kaufman RJ. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes & development 13:1211-1233

8- Liu CY, Kaufman RJ. (2003) The unfolded protein response. Journal of cell science 116:1861-1862

9- Mori K. (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. Cell 101:451-454

10- Ron D, Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nature reviews 8:519-529

11- Schroder M, Kaufman RJ. (2005) ER stress and the unfolded protein response. Mutation research 569:29-63

12- Casagrande R, Stern P, Diehn M, Shamu C, Osario M, Zuniga M, Brown PO, Ploegh H. (2000) Degradation of proteins from the ER of S. cerevisiae requires an intact unfolded protein response pathway. Molecular cell 5:729-735

13- Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T. (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. Nature cell biology, 2 379-384.

14- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. (2005) ERAD: the long road to destruction. Nature cell biology 7:766-772

15- Oyadomari S, Yun C, Fisher EA, Kreglinger N, Kreibich G, Oyadomari M, Harding HP, Goodman AG, Harant H, Garrison JL, Taunton J, Katze MG, Ron D. (2006) Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. Cell 126:727-739

16- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. Cell 101:249-258

17- Schroder M, Kaufman RJ. (2005) The mammalian unfolded protein response. Annual review of biochemistry 74:739-789

18- Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ. (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. Molecular cell 7:1165-1176

19- Martino ME, Olsen JC, Fulcher NB, Wolfgang MC, O'Neal WK, Ribeiro CM. (2009) Airway epithelial inflammation-induced endoplasmic reticulum Ca2+ store expansion is mediated by X-box binding protein-1. J Biol Chem 284:14904-14913

20-Ribeiro CM, O'Neal WK. (2012) Endoplasmic reticulum stress in chronic obstructive lung diseases. Current molecular medicine 12:872-882

21- van 't Wout EF, van Schadewijk A, van Boxtel R, Dalton LE, Clarke HJ, Tommassen J, Marciniak SJ, Hiemstra PS. (2015) Virulence Factors of Pseudomonas aeruginosa Induce Both the Unfolded Protein and Integrated Stress Responses in Airway Epithelial Cells. PLoS pathogens 11:e1004946

22- Celli J, Tsolis RM. (2015) Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes? Nature reviews 13:71-82

23- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM. (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. J Biol Chem 277:21836-21842

24- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. The Journal of clinical investigation 115:2656-2664

25- Haas IG, Wab M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. Nature 306:387-389

26- Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ. (1997) Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. J Biol Chem 272:4327-4334

27- Munro S, Pelham HR. (1986) An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. Cell 46:291-300

28- Shiu RP, Pouyssegur J, Pastan I. (1977) Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteinsin Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 74:3840-3844

29- Kohno K. (2007) How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress. Antioxidants & redox signaling 9:2295-2303

30- Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. Molecular and cellular biology 18:7499-7509

31- Cox JS, Shamu CE, Walter P. (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. Cell 73:1197-1206

32- Zhu C, Johansen FE, Prywes R. (1997) Interaction of ATF6 and serum response factor. Molecular and cellular biology 17:4957-4966

33- Harding HP, Calfon M, Urano F, Novoa I, Ron D. (2002) Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. Annual review of cell and developmental biology 18:575-599

34- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nature cell biology 2:326-332

35- Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. (2005) Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. Molecular and cellular biology 25:921-932 36- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Developmental cell 3:99-111

37- Ma K, Vattem KM, Wek RC. (2002) Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. J Biol Chem 277:18728-18735

38- Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. (2000) Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. J Biol Chem 275:27013-27020

39- Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. Nature 332:462-464

40- Lee AS. (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods 35:373-381

41- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245:1073-1080

42- Kerbiriou M, Le Drevo MA, Ferec C, Trouve P. (2007) Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6. Biochim Biophys Acta 1772(11-12):1236-49

43- Bartoszewski R, Rab A, Jurkuvenaite A, Mazur M, Wakefield J, Collawn JF, Bebok Z. (2008) Activation of the Unfolded Protein Response by {Delta}F508 CFTR. Am J Respir Cell Mol Biol 39(4):448-457

44- Gomes-Alves P, Couto F, Pesquita C, Coelho AV, Penque D. (2010) Rescue of F508del-CFTR by RXR motif inactivation triggers proteome modulation associated with the unfolded protein response. Biochim Biophys Acta 1804:856-865

45- Pahl HL, Baeuerle PA. (1995) A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. The EMBO journal 14:2580-2588

46- Blohmke CJ, Mayer ML, Tang AC, Hirschfeld AF, Fjell CD, Sze MA et al. (2012) Atypical Activation of the Unfolded Protein Response in Cystic Fibrosis Airway Cells Contributes to p38 MAPK-Mediated Innate Immune Responses. J Immunol 189:5467-5475

47- Cohen-Cymberknoh M, Kerem E, Ferkol T, Elizur A. (2013) Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. Thorax 68:1157-1162

48- Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. (2012) ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? Trends in molecular medicine 18(10):589-598

49- Zhang K, Kaufman RJ. (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. Nature 454:455-462

50- Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT et al. (2006) Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. Cell 124:587-599

51- Weber AJ, Soong G, Bryan R, Saba S, Prince A. (2001) Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl- channel function. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281:L71-78

52- Rab A, Bartoszewski R, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Collawn JF, Bebok Z. (2007) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. Am J Physiol Cell Physiol 292:C756-C766

53- Bebok Z, Collawn JF, Wakefield J, Parker W, Li Y, Varga K, Sorscher EJ, Clancy JP. (2005) Failure of cAMP agonists to activate rescued Δ F508 CFTR in CFBE410- airway epithelial monolayers. J Physiol 569:601-615

54- Chen X, Shen J, Prywes R. (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. J Biol Chem 277:13045-13052

55- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell 10:3787-3799

56- Shen J, Prywes R. (2005) ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. Methods 35:382-389

57- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R et al. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. Molecular cell 6:1355-1364

58- Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. (2004) Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. Journal of biochemistry 136:343-350

59- Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H et al. (2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. Developmental cell 13:365-376

60- Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J et al. (2007) ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. Developmental cell 13:351-364

61- Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. (2008) ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. Cell Struct Funct 33:75-89

62- Damiano F, Tocci R, Gnoni GV, Siculella L. (2015) Expression of citrate carrier gene is activated by ER stress effectors XBP1 and ATF6alpha, binding to an UPRE in its promoter. Biochim Biophys Acta 1849:23-31

63- Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. (2008) Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. Science 320:1492-1496

64- Glimcher LH. (2010) XBP1: the last two decades. Annals of the rheumatic diseases 69(1):67-71

65- Kim I, Xu W, Reed JC. (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov 7:1013-1030

66- Oyadomari S, Mori M. (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ 11:381-389

67- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. Molecular cell 5:897-904

68- Namba T, Ishihara T, Tanaka K, Hoshino T, Mizushima T. (2007) Transcriptional activation of ATF6 by endoplasmic reticulum stressors. Biochemical and biophysical research communications 355:543-548

69- Okada T., Haze K., Nadanaka S., Yoshida H., Seidah N.G., Hirano Y et al. (2003) A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. J Biol Chem 278:31024-31032

70- Bruscia E, Sangiuolo F, Sinibaldi P, Goncz KK, Novelli G, Gruenert DC. (2002) Isolation of CF cell lines corrected at DeltaF508-CFTR locus by SFHR-mediated targeting. Gene Ther 9:683-685

71- Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, Kuo WL, Stanton BA, Gruenert DC. (1993) An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. Am J Respir Cell Mol Biol 8:522-529 72- Illek B, Maurisse R, Wahler L, Kunzelmann K, Fischer H, Gruenert DC. (2008) Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates with CFTR mRNA expression levels. Cell Physiol Biochem 22:57-68

73- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275

74- Farre C, Stoelzle S, Haarmann C, George M, Bruggemann A, Fertig N. (2007) Automated ion channel screening: patch clamping made easy. Expert opinion on therapeutic targets 11:557-565

75- Benz N., Le Hir S., Norez C., Kerbiriou M., Calvez M.L., Becq F et al. (2014) Improvement of chloride transport defect by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cystic fibrosis epithelial cells. PLoS ONE 9:e88964

76- Carlile GW, Robert R, Zhang D, Teske KA, Luo Y, Hanrahan JW et al. (2007) Correctors of protein trafficking defects identified by a novel high-throughput screening assay. ChemBioChem 8:1012-1020

77- Huguet F, Calvez ML, Benz N, Le Hir S, Mignen O, Buscaglia P et al. (2016) Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR. Cellular and Molecular Life Sciences 73 (17):3351-3373

78- Pasquatoa A, Rochata C, Burria DJ, Pasquala G, de la Torreb JC, Kunza S. (2012) Evaluation of the anti-arenaviral activity of the subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease inhibitor PF-429242. Virology 423:14-22

79- Farinha CM, Sousa M, Canato S, Schmidt A, Amaral MD. (2015) Increased efficacy of VX-809 in different cellular systems results from an early stabilization effect of F508del-CFTR. Pharmacol Res Perspect (4):e00152

80- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J et al. (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res 43:D447-452

81- Shang J. (2005) Quantitative measurement of events in the mammalian unfolded protein response. Methods 35:390-394

82- Han SP, Tang YH, Smith R. (2010) Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. Biochemical Journal 430(3):379-392

83- Pinol-Roma S, Dreyfuss G. (1992) Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. Nature 355:730-732

84- Martinez-Contreras R, Fisette JF, Nasim FH, Madden R, Cordeau M, Chabot B. (2006) Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing. PLoS Biol 4:172-185

85- Carpenter B, MacKay C, Alnabulsi A, MacKay M, Telfer C, Melvin WT et al. (2006) The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. Biochim Biophys Acta 1765:85-100

86- Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. Nature Genet 3:151-156

87- Grammatikakis I, Zhang P, Panda AC, Kim J, Maudsley S, Abdelmohsen K et al. (2016) Alternative splicing of neuronal differentiation factor TRF2 regulated by HNRNPH1/H2. Cell Rep 15:926-934

88- Mahé D, Mähl P, Gattoni R, Fischer N, Mattei MG, Stévenin J et al. (1997) Cloning of Human 2H9 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins. The Journal of Biological Chemistry 272:1827-1836

89- Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. J Cell Physiol 193:154-163

90- Lee AS. (1981) The accumulation of three specific proteins related to glucoseregulated proteins in a temperature-sensitive hamster mutant cell line K12. J Cell Physiol 106:119-125 91- Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. (1994) Protein disulphide isomerase: building bridges

in protein folding. Trends Biochem Sci 19:331-336

92- Elliott JG, Oliver JD, High S. (1997) The thiol-dependent reductase ERp57 interacts specifically with N-glycosylated integral membrane proteins. J Biol Chem 272:13849-13855 93- Singh OV, Pollard HB, Zeitlin PL. (2008) Chemical Rescue of Δ F508-CFTR Mimics Genetic Repair in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. Mol Cell Proteomics 7(6):1099-1110

94- Lindquist S, Craig EA. (1988) The heat-shock proteins. Annu Rev Genet 22:631-677

95- De Los R., Goloubinoff P. (2016) Hsp70 chaperones use ATP to remodel native protein oligomers and stable aggregates by entropic pulling. Nat Struct Mol Biol 23:766-769

96- Radons J. (2016) The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? Cell Stress Chaperones 21:379-404

97- Sharma SK, De Los RP, Christen P, Lustig A, Goloubinoff P. (2010) The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. Nat Chem Biol 6:914-920

98- Carra S, Alberti S, Arrigo PA, Benesch JL, Benjamin IJ, Boelens W et al. (2017) The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions. Cell Stress and Chaperones doi:10.1007/s12192-017-0787-8

99- Yang Y, Janich S, Cohn JA, Wilson J. (1993) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. Proc Natl Acad Sci USA 90:9480-9484

100- Zuiderweg ER, Hightower LE, Gestwicki JE. (2017) The remarkable multivalency of the Hsp70 chaperones. Cell Stress Chaperones 22:173-189

101- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. Nat Rev Mol Cell Biol 5:781-791

102- Hohfeld J, Hartl FU. (1994) Post-translational protein import and folding. Curr Opin Cell Biol 6:499-509

103- Demand J, Luders J, Hohfeld J. (1998) The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. Mol Cell Biol 18:2023-2028

104- Majeski AE, Dice JF. (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. Int J Biochem Cell Biol 36:2435-2444

105- Younger JM, Ren HY, Chen L, Fan CY, Fields ., Patterson C et al. (2004) A foldable CFTR {Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. J Cell Biol 167:1075-1085

106- Amaral MD. (2004) CFTR and chaperones: processing and degradation. J Mol Neurosci 23:41-48

107- Webster TJ, Naylor DJ, Hartman DJ, Hoj PB, Hoogenraad NJ. (1994) cDNA cloning and efficient mitochondrial import of pre-mtHSP70 from rat liver. DNA Cell Biol 13:1213-1220

108- Wadhwa R, Taira K, Kaul SC. (2002) An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: What, when, and where? Cell Stress Chaperones 581:3702-3710

109- Ran Q, Wadhwa R, Kawai R, Kaul SC, Sifers RN, Bick RJ et al. (2000) Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. Biochem Biophys Res Commun 275:174-179
110- Qu M, Zhou Z, Xu S, Chen C, Yu Z, Wang D. (2011) Mortalin overexpression attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Brain Res 1368:336-345

111- Xu L, Voloboueva LA, Ouyang Y, Emery JF, Giffard RG. (2009) Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 in rat brain protects mitochondria, reduces oxidative stress, and protects from focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 29:365-374

112- Dores-Silva PR, Barbosa LRS, Ramos CH, Borges JC. (2015) Human Mitochondrial Hsp70 (Mortalin): Shedding Light on ATPase Activity, Interaction with Adenosine Nucleotides, Solution Structure and Domain Organization. PLoS One 10(1):e0117170

113- Taurin S, Seyrantepe V, Orlov SN, Tremblay TL, Thibault P, Bennett MR et al. (2002) Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio in cultured vascular smooth muscle cells. Circ Res 91:915-922

114- Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R. (2007) Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer. Experimental Gerontology 42:263-274

115- Lopitz-Otsoa F, Rodriguez-Suarez E, Aillet F, Casado-Vela J, Lang V, Matthiesen R et al. (2012) Integrative analysis of the ubiquitin proteome isolated using Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs). J Proteomics 75(10):2998-3014

116- Danielsen JM, Sylvestersen KB, Bekker-Jensen S, Szklarczyk D, Poulsen JW, Horn H et al. (2011) Mass spectrometric analysis of lysine ubiquitylation reveals promiscuity at site level. Mol Cell Proteomics 10(3):M110.003590

117- Gururaja T, Li W, Noble WS, Payan DG, Anderson DC. (2003) Multiple functional categories of proteins identified in an in vitro cellular ubiquitin affinity extract using shotgun peptide sequencing. J Proteome Res 2(4):394-404

118- Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK et al. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. Proc Natl Acad Sci USA 104(29):12011-12016

119- Ward CL, Omura S, Kopito RR. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitinproteasome pathway. Cell 83(1):121-127

120- Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K et al. (2004) Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. J Cell Biol 164(6) :923-933

121- Crinelli R, Bianchi M, Radici L, Carloni E, Giacomini E, Magnani M. (2015) Molecular Dissection of the Human Ubiquitin C Promoter Reveals Heat Shock Element Architectures with Activating and Repressive Functions. PLoS One 10(8):e0136882

122- Thuerauf DJ, Morrison L, Glembotski CC. (2004) Opposing Roles for ATF6 α and ATF6 β in Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Induction. The Journal of Biological Chemistry 279(20):21078-21084

123- Thuerauf DJ, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. (2007) Effects of the Isoformspecific Characteristics of ATF6 α and ATF6 β on Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Expression and Cell Viability. The Journal of Biological Chemistry 282:22865-22878

124- Trouvé P, Génin E, Férec C. (2016) In silico search for modifier genes associated with Pancreatic and Liver Disease in Cystic Fibrosis. PLoSONE 12(3):e0173822

Legends to the figures.

Figure 1. The UPR is triggered in CFBE41o-/F508del cells. A. Representative immunodetection experiments of the BiP (78 kDa, top gel), ATF6 90 kDa (middle gel) and cleaved ATF6 (50 kDa, bottom gel) proteins in CFBE41o- cells overexpressing either CFTR-WT or the F508del-CFTR. **B.** Statistical analysis of BiP (left, n = 6), ATF6 90 kDa (middle, n = 6) and ATF6 50 kDa (right, n = 5) expression in CFBE41o-/WT and in CFBE41o-/F508del cells. A significant increased expression of BiP and ATF6 (90 and 50 kDa) was observed in the cells expressing the mutated CFTR.

Figure 2. BiP expression is decreased by AEBSF in CFBE41o-/F508del cells. A. The upper image is a representative gel showing BiP expression in untreated cells (n = 4). The lower image shows a western blot analysis of the expression of BiP in AEBSF treated cells (300 μ M, n = 3 to 5) at different time points (0; 0.5; 1; 2; 4 or 8 hours). B. Bar graphs represent the quantification of BiP expression under AEBSF treatment. A significant decreased expression of BiP was observed for the 4h and 8h time points.

Figure 3. The uncleaved form of ATF6 (90kDa) is decreased by AEBSF in CFBE41o-/F508del cells. A. The upper image is a representative gel showing ATF6 expression in untreated cells (n = 4). The lower image shows a western blot analysis of the expression of ATF6 in AEBSF treated cells (300μ M, n = 3 to 5) at different time points (0; 0.5; 1; 2; 4 or 8 hours). B. Bar graphs represent the quantification of ATF6 expression under AEBSF treatment. A decreased expression was observed for the 0.5, 1 and 2 hours time points, whereas the expression was increased for the 4 and 8 hours time points.

Figure 4. The active form of ATF6 (50kDa) is decreased by AEBSF in CFBE41o-/F508del cells. A. The upper image is a representative gel showing the expression of the active form of ATF6 in untreated cells (n = 4). The lower image shows a western blot analysis of the expression of the active form of ATF6 in AEBSF treated cells (300μ M, n = 3 to 5) at different time points (0; 0.5; 1; 2; 4 or 8 hours). B. Bar graphs represent the quantification of the cleaved ATF6 expression under AEBSF treatment. A significant decreased expression of this ATF6 form was observed for the 1, 2, 4 and 8 hours time points.

Figure 5. Expression of S1P in cells expressing Wt- and F508del-CFTR cells, with and without AEBSF treatment. A. The left image shows a representative immunodetection experiment of the S1P protein (110 kDa) in cells expressing either Wt- or F508del-CFTR. The right image shows the corresponding statistical analysis of S1P expression (n = 6). No significant difference was observed between the two cell lines. **B.** The upper image is a representative gel showing S1P expression in untreated cells (n = 3). The middle image is a representative gel showing S1P expression in AEBSF treated cells (300 μ M) at different time points (0.5; 1; 2; 4 or 8 hours; n = 4 to 5). The bottom image is the statistical analysis of S1P expression tended to be decreased in treated cells after 0.5 hour treatment, significance was only observed at the 2 hours time point.

Figure 6. F508del-CFTR CI⁻ channel activity is partially restored by AEBSF in cells expressing F508del-CFTR. A. The top image shows a representative current-voltage (I-V) relationships for CFTR channels in Wt-CFTR (light grey), F508del-CFTR (dark grey) and in AEBSF treated F508del-CFTR cells (300 μ M, 48 hours). B. The bar graphs show the statistical analysis of CFTR function in Wt-CFTR cells (n = 5), in F508del-CFTR cells (n = 6) and in treated F508del-CFTR cells (300 μ M AEBSF, 48 hours, n = 4). The analysis was performed using pA/pF values at +80mV. As expected, Cl⁻ currents were significantly lower in cells expressing F508del-CFTR than in cells expressing Wt-CFTR. Despite Cl⁻ currents were significantly lower in treated F508del-CFTR cells than in cells expressing Wt-CFTR, an important and significant increase (+153%) was observed in treated F508del-CFTR cells when compared to untreated cells expressing F508del-CFTR.

Figure 7. F508del-CFTR CI⁻ channel activity is partially restored by PF-429242 in cells expressing F508del-CFTR. A. The top image shows a representative current-voltage (I-V) relationships for CFTR channels in Wt-CFTR (light grey), F508del-CFTR (dark grey) and in PF-429242 treated F508del-CFTR cells (10 μ M, 48 hours). B. The bar graphs show the statistical analysis of CFTR function in Wt-CFTR cells (n = 5), in F508del-CFTR cells (n = 6) and in treated F508del-CFTR cells (10 μ M PF-429242, 48 hours, n = 5). The analysis was performed using pA/pF values at +80mV. As expected, CI⁻ currents were significantly lower in cells expressing Wt-CFTR. Despite CI⁻ currents were significantly lower in treated F508del-CFTR cells than in cells expressing Wt-CFTR, an important and significant increase (+152%) was observed in treated F508del-CFTR cells were fully comparable to those obtained with AEBSF, as shown in Fig. 6.

Figure 8. Detection of F508del-CFTR within membranes before and after AEBSF treatment. WT-CFTR or F508del-CFTR with a 3-Haemaglutinin (HA)-epitope tag present within cell membranes were detected with an anti-HA antibody, selected by protein G magnetic beads, probed with a anti-HA antibody and revealed by a HRP conjugated antibody. The image shows and example of resulting detection with the following samples: 1, control (cells expressing Wt-CFTR which were not incubated with anti-HA antibody; 3, cells expressing F508del-CFTR which were incubated with anti-HA antibody; 4, cells expressing F508del-CFTR which were not incubated with anti-HA antibody; 48 hours) treated cells expressing F508del-CFTR which were incubated with anti-HA antibody; 6, supernatant of the protein G magnetic beads. No CFTR detection was detected in the negative control lane (1). The mature form of CFTR (C band) was observed in cells expressing Wt-CFTR cells. In the presence of anti-HA antibody whereas it was absence in F508del-CFTR cells. In the F508del-CFTR, the mature form of CFTR, likely representing the CFTR within membrane, was only observed after AEBSF treatment (lane 5).

Figure 9. Example of 2-DE gels. 2-DE gels were performed in order to detect differentially expressed protein before and after AEBSF treatment (48 hours). 4 gels (pH 3-10) were performed with both treated and untreated cells and spots were further analyzed by PDQuest software (BioRad). 4 spots were increased in controls (upper panel) and 4 spots were increased in treated cells (lower panel). These spots were further analyzed by MS.

Figure 10. PPI networks of the differentially expressed proteins when ATF6 is inhibited or not. The recent 10.0 version of STRING (High confidence ≥ 0.9) was used. Graphs for HNRNPH1, HNRH3, PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 were retrieved and were observed that all these proteins share a common interaction protein. Therefore, we gathered the graphs and drew a single graph showing that Ubiquitin C (UBC) is a common interaction protein for our differentially expressed proteins when ATF6 is inhibited. Colored nodes are query proteins (red) and first shell of interactors. It can be noticed that HSP7C and HSP71, as well as UBC do directly interact with CFTR. Edges represent experimentally determined PPI (pink). Blue edges represent protein homologies.

Figure 11. Schematic representation of the impact of the inhibition of the cleavage of ATF6 in cells expressing F508del-CFTR. Black arrows show the normal processing of F508del-CFTR and normal ubiquitination process. Red arrows show the positive effects of the inhibition of the cleavage of ATF6 upon F508del-CFTR, according with the known effects of each protein which were highlighted in the present work. Red dashed lines indicate the possible side effects of Hsc70 and Hsp70.

| Spot | Accession number UniProtKB | Description | MW | Pi | Coverage % | log(E value) | Number of spectra for protein identification |
|------|----------------------------------|--|------|------|---------------|--------------|---|
| 1 | P31943 | HNRNPH1_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein | 49,1 | 5.89 | 38 | -102,2701645 | 66 |
| 2 | P31942-2 | HNRH3_HUMAN Isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 | 35,1 | 6.36 | 28 | -48,68246078 | 22 |
| 3 | P30101 | PDIA3_HUMAN Protein disulfide- isomerase A3 | 56,7 | 5.98 | 45 | -172,0068665 | 37 |
| 4 | P11142 | HSP7C_HUMAN Heat shock cognate 71 kDa protein (HspA8) | 70,8 | 5.87 | 37 | -132,8794556 | 51 |
| 5 | P38646 | GRP75_HUMAN Stress-70 protein | 73,5 | 5.87 | 18 | -58,63391113 | 16 |
| 6 | P0DMV8 (New nomenclature) | HSP71_HUMAN Heat shock 70 kDa protein HspA1A/ HspA1B | 69,9 | 5.47 | 29 | -126,2914658 | 39 |

Table 1. Spots identification by MS.

| Protein | Behaviour when ATF6 is inhibited | Protein function | Involvement in CF | |
|-------------------------------|--|---|---|--|
| HNRNPH1 | Decreased | HNRNPH1 belongs to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) complexes and mediates pre-mRNA alternative splicing regulation. It inhibits alternative splicing in neurons [88]. | Involved in the modulation of post-transcriptional processing of CFTR mRNA transcripts [86]. | |
| HNRH3 | Decreased | Ribonucleoprotein are responsible for RNA splicing and processing [88]. | Involved in the modulation of post-transcriptional processing of CFTR mRNA transcripts [86]. | |
| PDIA3 (Grp58) | Increased | PDIA3 is a member of the protein disulfide isomerase family mainly present in the ER. It is a chaperone and a disulfide-reshuffling enzyme [91]. Together with calnexin and calreticulin, it is involved in the correct folding of glycoproteins within the ER [92]. | Glucose-regulated protein 58 kDa/PDIA3 is present in CFTR's complex and is up-regulated when F508del-CFTR is chemically or genetically rescued [93]. | |
| HSP7C (HspA8) | HSP7C HspA8) Increased Hsc70 forms a cytosolic complex with CHI E3 and cooperates with the ER membran associated ubiquitin ligase complex to favou triage of proteins [105]. | | Heat shock cognate 70 (Hsc70), together with Hsp70, is involved in the folding of CFTR [105]. Both Wt- and F508del-CFTR bind to Hsc70 but F508del increases the affinity of CFTR [106]. | |
| GRP75 | Increased | Involved in stress response, intracellular trafficking and cell differentiation and proliferation [114]. | GRP75 is up-regulated when F508del-CFTR is chemically or genetically rescued [93]. | |
| HSP71 (HspA1A) (HspA1B) | Increased | Protects the proteome from stress. Involved in the folding and transport of polypeptides, the activation of proteolysis of misfolded proteins. Has a pivotal role in the protein quality control system of misfolded proteins and in their targeting to degradation [98]. Possesses ATPase activity [95]. | Hsp70 associates with both Wt- CFTR and F508del-CFTR. It dissociates from Wt-CFTR when it is transported from the ER to the Golgi. F508- CFTR/Hsp70 forms a stable complex permitting the degradation of F508del-CFTR in the pre-Golgi, nonlysosomal, compartments [99]. | |

Table 2. Summary of the highlighted protein analysis.



B























B



Figure 8











II. Partie 2 : Le magnésium dans la mucoviscidose

Introduction

Plusieurs études ont montré que le Mg^{2+} est impliqué dans l'expression et la fonction du CFTR. Il apparaît que la régulation de ce cation divalent doit être optimale dans des cellules exprimant le CFTR. Nous avons par conséquent émis l'hypothèse que la $[Mg^{2+}]_i$ pouvait être dérégulée dans la mucoviscidose et être à l'origine de certaines altérations rencontrées dans des cellules exprimant un CFTR muté.

Afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse, le premier objectif de cette étude était de mesurer, et ce, pour la première fois, la $[Mg^{2+}]_i$ de cellules exprimant soit un CFTR-WT, un CFTR absent de la membrane (CFTR-F508del) ou un CFTR présent à la membrane mais non fonctionnel (CFTR-G551D).

A la suite de cette mesure, si des différences de $[Mg^{2^+}]_i$ se présentaient, le but de l'étude était d'une part de déterminer l'origine de telles différences et d'autre part de savoir si la modulation de la $[Mg^{2^+}]_i$ pouvait avoir un impact sur la fonction du CFTR.

Résultats

Afin d'atteindre nos objectifs, nous avons mesuré, grâce à une sonde magnésique, la $[Mg^{2+}]_i$ dans des cellules HeLa non-transfectées (NT) ou transfectées de manière stable avec un plasmide codant un CFTR-WT, F508del ou G551D. Les résultats obtenus ont montré que la $[Mg^{2+}]_i$ était significativement plus basse dans les HeLa-NT, F508del et G551D en comparaison des HeLa-WT.

Nous avons voulu connaître l'origine de ces différences et avons donc mesuré par Western blot l'expression de TRPM7, le principal régulateur de la $[Mg^{2+}]_i$. TRPM7 est plus exprimé dans les HeLa-NT et les deux mutants du CFTR, sans que ce soit dû à une différence d'expression de son ARNm que nous avons mesuré par PCR quantitative. Si la $[Mg^{2+}]_i$ est moins élevée dans les mutants mais que l'expression de TRPM7 est supérieure, nous avons émis l'hypothèse que la fonction de TRPM7 dans ces cellules pourrait être altérée. Nous avons confirmé cette hypothèse par mesure des courants TRPM7 par *whole patch-clamp*, nettement inférieurs dans les mutants en comparaison des HeLa-WT. Afin de confirmer la mesure des courants associés à TRPM7, nous avons ajouté du Mg²⁺ dans le milieu intracellulaire. TRPM7 est en effet inhibé par une $[Mg^{2+}]_i$ élevée et nous avons pu l'observer. Nous avons par la suite cherché à savoir s'il existait une relation fonctionnelle entre TRPM7 et le CFTR. Pour cela, nous avons activé TRPM7 par du Naltriben et avons procédé aux mesures de courant Cl⁻ liés au CFTR dans les HeLa-WT et mutantes. L'activation de TRPM7 a montré une inhibition des courants liés au CFTR-WT et F508del. En revanche, une augmentation de plus de 800 % des courants Cl⁻ a été mesuré dans des HeLa-G551 à la suite de l'activation de TRPM7.

Discussion

Ces résultats montrent pour la première fois que la $[Mg^{2^+}]_i$ n'est pas la même chez tous les mutants du CFTR, au même titre que l'expression et l'activité de TRPM7.

Ces résultats permettent également de voir qu'il existe une interaction fonctionnelle entre TRPM7 et le CFTR.

D'autres investigations seront nécessaires afin d'obtenir de plus amples informations mais il semblerait que des composés tels que le Naltriben permettant l'activation de TRPM7 puissent agir en tant que potentiateurs du CFTR, ouvrant la voie vers de nouvelles pistes thérapeutiques dans la lutte contre la mucoviscidose.

ORIGINAL ARTICLE



Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR

F. Huguet^{1,2} · M. L. Calvez^{1,2,3} · N. Benz^{1,3} · S. Le Hir^{1,4} · O. Mignen^{1,2} · P. Buscaglia^{1,2} ·
F. D. Horgen⁵ · C. Férec^{1,2,4,6} · M. Kerbiriou^{1,2} · P. Trouvé¹

Received: 8 June 2015/Revised: 14 January 2016/Accepted: 25 January 2016/Published online: 13 February 2016 © Springer International Publishing 2016

Abstract Cystic fibrosis (CF), one of the most common fatal hereditary disorders, is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. The CFTR gene product is a multidomain adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) protein that functions as a chloride (Cl⁻) channel that is regulated by intracellular magnesium $[Mg^{2+}]_i$. The most common mutations in *CFTR* are a deletion of a phenylalanine residue at position 508 (Δ F508-CFTR, 70–80 % of CF phenotypes) and a Gly551Asp substitution (G551D-CFTR, 4–5 % of alleles), which lead to decreased or almost abolished Cl⁻ channel function, respectively. Magnesium ions have to be finely regulated within cells for optimal expression and function of CFTR. Therefore, the melastatin-like transient receptor potential cation channel,

F. Huguet and M. L. Calvez participated to the same extend to the present work.

- C. Férec claude.ferec@univ-brest.fr
- P. Trouvé pascal.trouve@univ-brest.fr
- ¹ Inserm, UMR1078, 46, rue Félix le Dantec, CS 51819, 29218 Brest Cedex 2, France
- ² Faculté de Médecine et des sciences de la santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest 29200, France
- ³ Association G. Saleun, Brest 29218, France
- ⁴ Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hôpital Morvan, C.H.U. Brest, Brest 29200, France
- ⁵ Laboratory of Marine Biological Chemistry, Department of Natural Sciences, Hawaii Pacific University, Kaneohe, HI 96744, USA
- ⁶ Etablissement Français du Sang Bretagne, Brest 29200, France

subfamily M, member 7 (TRPM7), which is responsible for Mg^{2+} entry, was studies and $[Mg^{2+}]_i$ measured in cells stably expressing wildtype CFTR, and two mutant proteins (Δ F508-CFTR and G551D-CFTR). This study shows for the first time that $[Mg^{2+}]_i$ is decreased in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR mutated proteins. It was also observed that the expression of the TRPM7 protein is increased; however, membrane localization was altered for both Δ F508del-CFTR and G551D-CFTR. Furthermore, both the function and regulation of the TRPM7 channel regarding Mg²⁺ is decreased in the cells expressing the mutated CFTR. Ca²⁺ influx via TRPM7 were also modified in cells expressing a mutated CFTR. Therefore, there appears to be a direct involvement of TRPM7 in CF physiopathology. Finally, we propose that the TRPM7 activator Naltriben is a new potentiator for G551D-CFTR as the function of this mutant increases upon activation of TRPM7 by Naltriben.

Introduction

Cystic fibrosis (CF), one of the most common fatal hereditary disorders in Caucasians, is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene on chromosome 7 [1–3]. Translation of CFTR mRNA results is a 1480 residue with a predicted molecular mass of 168 kilodaltons (kDa) [2]. CFTR is a multidomain adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) protein responsible for the regulation of chloride (Cl⁻) transmembrane transport, as well as many other ions such as halides (permeation sequence $P_{\rm I} > P_{\rm Br} > P_{\rm Cl} > P_{\rm F}$; [4]) and polyatomic anions

🖄 Springer

[5], and also to some small uncharged molecules [6]. Also, CFTR function is critical in maintaining fluid homeostasis, airway fluid clearance and airway submucosal glands secretion [7, 8].

The most common mutation causing CF is a deletion of a phenylalanine residue at position 508 (Δ F508-CFTR), which is responsible for 70–80 % of CF phenotypes worldwide [8–10]. The Δ F508-CFTR protein is misfolded, retained in the endoplasmic reticulum (ER) and prematurely degraded. The limited amount of Δ F508-CFTR protein that reaches the plasma membrane is unstable, resulting in a rapid redirection from endosomal recycling towards lysosomal delivery and degradation [11–13]. Another mutation, Gly551Asp (G551D) also called "the Celtic mutation", accounts for 4–5 % of alleles, and exhibits normal protein expression and cell surface localization. Nevertheless, it is associated with a severe form of CF pathology as Cl⁻ channel function is lacking [14–17].

Under normal conditions, wildtype CFTR (WT-CFTR) is a Cl⁻ channel activated by protein kinases A and C (PKA and PKC) and deactivated by dephosphorylation by a high number of protein phosphatases [15, 16]. WT-CFTR is also regulated by protein-protein interactions involving synaptosomal-associated protein 23 (SNAP23) and syntaxin 1A, Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (NHERF), CFTR-associated protein of 70 kDa (CAP70), CFTR-associated ligand (CAL) and annexin A5 [20-28]. CFTR is also regulated by divalent cations, the most studied being calcium (Ca2+) ions. Indeed, it was clearly reported that Ca²⁺ homeostasis is altered in CF [29]. An abnormal spatial diffusion of Ca²⁺ in airway epithelial cells derived from CF patients with the Δ F508-CFTR mutation was observed, due to an accumulation of inositol 1,4,5trisphosphate (IP3) in the ER [30] and to dysfunction Ca^{2+} uptake in mitochondria [31]. An increased Ca^{2+} uptake is a hallmark of CF [32], but when the function of CFTR is restored, for example using Miglustat, Ca²⁺ homeostasis is normalized [33]. Intracellular magnesium ($[Mg^{2+}]_i$) is also important for the regulation of CFTR. The use of ionophore A23187 or ionomycine in human bronchial cells increases $[Mg^{2+}]_i$ and leads to a time- and dose-dependent decrease in the expression of CFTR mRNA [34]. By contrast, decreased $[Mg^{2+}]_i$ leads to reduced opening and closing rates of the CFTR channel [34]. In fact, $[Mg^{2+}]_i$ controls the closing rate of CFTR, likely in conjuction with ATP. It is well established that ATP hydrolysis by nucleotide binding domain 2 (NBD2) of CFTR is decreased when $[Mg^{2+}]_i$ is also decreased [35], the role of Mg-ATP upon CFTR's function being more efficient than that of ATP alone [36].

Due to the fact that Mg^{2+} has to be finely regulated within cells for optimal CFTR expression and function, our aim was to study the melastatin-like transient receptor

Deringer

potential cation channel, subfamily M, member 7 (TRPM7) in non-transfected Hela cells (NT) and in cells expressing WT-CFTR, ΔF508-CFTR and G551D-CFTR. TRPM7, which is a member of the melastatin-like transient receptor potential cation channel, subfamily M (TRPM) family, is ubiquitously expressed and possesses both an ion pore channel and a functional serine/threonine α-kinase domain to provide cellular influx for Ca2+, Mg2+ and divalent metals [37-40]. Being a channel and having an enzymatic activity, TRPM7 is often called chanzyme. The TRPM7 protein, which is the main cellular regulator of $[Mg^{2+}]_i$ [41], is slightly more permeable to Mg^{2+} than to Ca^{2+} and is regulated by Mg²⁺ or Mg-ATP [38, 42-44]. Indeed, TRPM7 has the following selectivity profile for divalent cations: $Zn^{2+} \approx Ni^{2+} > Ba^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} \ge Mn^{2+}$ \geq Sr²⁺ \geq Cd²⁺ \geq Ca²⁺ [43]. A remarkable finding being that trace divalent metal ions are significantly more permeable through TRPM7 than the dominant physiological divalent metal ions Ca^{2+} and Mg^{2+} [43]. Therefore, we studied the expression, the function and the channel regulation of TRPM7 by [Mg²⁺]_i in NT cells and in cells expressing WT-CFTR or mutated CFTR (Δ F508-CFTR and G551D-CFTR). The function of CFTR was further studied when TRPM7 function was modulated by specific drugs.

We show for the first time that $[Mg^{2+}]_i$ is decreased in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR. The protein expression of TRPM7 was increased in these cells whereas its function and Mg^{2+} regulation were decreased. In order to highlight a possible functional link between TRPM7 and CFTR, TRPM7 activity was increased in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR by the use of Naltriben and the function of CFTR was studied. We found that the activation of TRPM7 resulted in a decreased CFTR function in Δ F508-CFTR cells and in a highly increased function in cells expressing G551D-CFTR. Mg²⁺ and Ca²⁺ flux through TRPM7 were found to be modulated in cells expressing mutated CFTR. We conclude that the link between TRPM7 and CFTR varies with the type of CFTR mutation. Finally, we propose that Naltriben is a new potentiator of G551D-CFTR with potential implications for CF therapy. Indeed, the TRPM7 activator Naltriben rescues the altered function associated with the G551D-CFTR mutation.

Materials and methods

Cell culture, quantitative PCR and western blotting

HeLa cells stably expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR and G551D-CFTR were obtained by lentiviral infection in which the cDNA encoding the human wildtype CFTR (WT-CFTR, Transgene SA, pTG5985, France, access

Genbank No. M28668) was used, before and after site directed mutagenesis. Hela cells stably expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR or G551D-CFTR were characterized previously [45]. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; E Healthcare, USA) plus 10 % calf serum in the presence of blasticidine (2 µg/ml).

Total RNA was extracted from cells using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, France), according to the manufacturer's instructions, and the quality was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, France). RNA was further quantified using a nanophotometer for further use in Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). RT-PCR was performed using Superscript II (InVitrogen, France). Quantitative PCR was performed using a Quantitect SYBR Green kit (Qiagen, France) and 3 µg of cDNA as tempate. TRPM7 primers were used as following: forward—CTTATGAAGAGGCAGGTCATGG and reverse-CATCTTGTCTGAAGGACTG. Actin primers were forward-GCATGGAGTCCTGTGGCATCC and reverse-GAGGCCAGGATGGAGCCG. Primers were tested for efficiency (E) using a standard curve analysis. E values were 107.83 and 105.32 % ($R^2 > 0.98$) for TRPM7 and actin, respectively. Optimal annealing temperature for the qPCR assay was determined by testing a range of temperatures above and below the calculated Tm (54 °C) of the primers. PCRs yielded 213 and 238 bp amplicons for TRPM7 and actin, respectively [46]. Reactions for TRPM7 were carried out with the following parameters: initial denaturation at 95 °C for 15 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 54 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. Relative quantification of the transcripts were assessed in a one-step format (300 ng total RNA) using a QuantiTect® $\ensuremath{\mathsf{SYBR}}^{\ensuremath{\$}}$ Green RT-PCR Kit (Qiagen) with an ABI $\ensuremath{\mathsf{PRISM}}^{\ensuremath{\texttt{®}}}$ 7700 sequence detection system.

The cells were lyzed in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 % SDS, in the presence of 1.1 µM leupeptin, 0.7 µM aprotinin, 120 µM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 1 µM iodoacetamide, 0.7 µM pepstatin and 1 mM diisopropyl phosphorofluoridate (DIFP). Protein concentrations were determined using Lowry's methodology with bovine serum albumin as a standard [47]. Equal amounts of total protein for each sample (50 µg) were subjected to 4-12 % gradient SDS/PAGE (InVitrogen, France). After blotting, the polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were incubated with anti-TRPM7 (1/1000; Abcam, France, [48]) or anti-Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH, 1/7000) antibodies and with secondary antibody (anti-mouse, abcam ab6820, 1/20,000). Visualization was performed using an ECL + detection kit (Amersham, France). Densitometric analysis of the signals was performed using a GelDoc 2000 apparatus (Bio-Rad, France) and each value was normalized to the total amount of

loaded proteins per lane determined by Coomassie blue staining of the membrane or to the G3PDH, which was estimated by densitometric analysis.

Measurements of [Mg²⁺]_i with Mag-Fura-2-AM

Cells were grown in glass bottomed, black wall 96-well plates (BD Falcon) for 1 day before experiments. They were washed three times with normal buffered salt solution (NBSS) containing: 135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.33 mM NaH₂PO₄, 5 mM Glucose and 10 mM HEPES (pH 7.4). Measurement of the background fluorescence was performed after the last wash. Cells were further incubated for 30 min at 37 °C in NBSS containing 5 µM Mag-Fura-2-AM (Molecular Probes, France) and 0.1 % Pluronic F-127. Cells were washed twice with NBSS containing 0.1 mM K₂EGTA in place of 1.2 mM CaCl₂ for 20 min at 37 °C and measurement of fluorescence was performed. All fluorescence measurements were performed on Varioskan® Flash (Thermo Scientific) at 37 °C. Excitation wavelengths were 335 nm and 375 nm and the emission wavelength was 505 nm (12 nm bandwidth). All measurements of background fluorescence were subtracted from fluorescence measurements for each wavelength. [Mg²⁺]_i was calculated from the ratio of fluorescence at the two excitation wavelengths described above, using a dissociation constant $(K_{\rm d})$ of 1.9 mM, for the Mag-Fura-2-AM/Mg²⁺ complex. Fluorescence at 335 (F(335)) and 375 (F(335)) nm were used to determine the R value (R = F(335)/F(375)). All values of the measured R were normalized to the standard R value with identical optics and converted to $[Mg^{2+}]_i$ using the standard equation $[Mg^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{min}/$ $R_{\text{max}} - R$). Cells were permeabilized with 20 μ M digitonin and the Rmax value was obtained by the addition of 50 mM MgCl₂ in absence of Ca². Rmin was determined by chelating Mg^{2+} with addition of 100 mM EDTA (pH 7.2).

Measurements of Ca²⁺ influx through TRPM7

Cells were plated (30,000 cells/well) in glass bottomed, black wall 96-well plates (BD Falcon) in DMEM containing 10 % calf serum without blasticidine during 1 day before experiment. The culture medium was removed and replaced with loading buffer containing: 137 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 560 μ M MgCl₂, 1 mM Na2HPO4, 5.5 mM Glucose, 10 mM HEPES (pH 7.4) and the Fura-2 QBT Calcium dye (Molecular Devices) during 60 min at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere. The Fura-2 QBTTM Calcium Kits contain Fura-2, AM, a cell permeable calcium indicator that is ratiometric and UV-light excitable. Loading buffer was removed and replaced by the same buffer without Fura-2 and Ca²⁺ (1.8 mM CaCl₂ was

Deringer

replaced by 100 µM EDTA). Fluorescence quenching measurements (excitation wavelength: 360 nm; emission wavelength: 510 nm) were realized using Flextation3 plate reader (Molecular Devices; SoftMax Pro v5.4) at 37 °C [49]. Basal fluorescence at 360 nm excitation was read during 2 min before the addition of 2 mM MnCl₂ to follow constitutive calcium entry for 13 min. In order to assess the implication of TRPM7 in Ca²⁺ entries, activator Naltriben and inhibitor Waixenicin A were added 15 min before starting the reading (50 and 15 µM, respectively). Slope values were first normalized to average initial fluorescence (*F*₀) measured between 0 and 2 min (*F*_t = ($\Delta F/F_0$; $\Delta F = F_{\rm t(360)} - F_{\rm 0})$ and then normalized to control values (WT-CFTR = 100 %). The slope of the quenching which was estimating Ca2+ entry was calculated with GraphPad Prism 5 and presented as average \pm SD. Different conditions were compared using t test.

Patch clamp analysis

Patch-clamp experiments were performed with an automatic electrophysiology workstation, Port-a-Patch (Nanion Technologies GmbH, Germany), coupled to an external amplifier unit HEKA EPC-10 [28, 50]. Whole-cell patchclamp recordings were performed at room temperature on isolated cells. Before recording, the culture medium was replaced by the external solution contained the following: 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES and 5 mM D-glucose monohydrate [41, 51]. The final pH value was adjusted to 7.4 with NaOH and the osmolarity was 298 mOsmol. The internal solution contained the following: 50 mM CsCl, 10 mM NaCl, 60 mM Cs-Fluoride, 20 mM EGTA and 10 mM HEPES/CsOH (pH 7.2; 285 mOsmol). Inhibition of TRPM7 was performed by increasing the free $[Mg^{2+}]_i$ from 0 to 200 μ M, using MaxChelator software available at http://www. stanford.edu/ \sim cpatton/webmaxcS.htm, for Mg²⁺ calculation [41, 52]. In some experiments, seals were enhanced using the seal enhancer solution containing: 80 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 35 mM CaCl₂, 10 mM HEPES (298 mOsmol). All voltages were corrected for a liquid junction potential of 10 mV between external and internal solutions. For TRPM7 measurements, currents were elicited by a ramp protocol from -100 to +100 mV over 50 ms acquired at 0.5 Hz and a holding potential of 0 mV, as previously described [41, 52]. Voltage-clamp pulses were generated and data were captured using the Patchmaster program (Nanion Technologies GmbH, Germany). Outward currents at +80 mV, normalized to cell size ranging from 20 to 35 pF, and plotted against time, were recorded. For CFTR measurements, voltage-dependent properties were assessed by applying voltage steps of 100 ms duration from a holding potential of -80 mV to

2 Springer

test potentials ranging from -80 to +80 mV, with 10 mV increments [28]. Activation and inhibition of TRPM7 were obtained by Naltriben methanesulfonate (50 µM) and Carvacrol (500 µM), respectively, as previously described [53–56]. CFTR-inhibitor solution (10 µM CFTRinh172, Sigma) and CFTR-activator solution [10 µM forskolin (FSK) and 30 µM genistein (GST)], both from Sigma were added to the external solution to inhibit or activate CFTR, respectively. For all graphic representations of *I–V* relationships, currents were normalized by membrane capacitances (20–35 pF) to remove variability due to differences in cell sizes. For each patch-clamp analysis, measurements were made on three different cells from four different cultures.

Immunofluorescence

Cells were seeded on cover slips and incubated at 37 °C until 50-60 % confluence was obtained. After two washes with phosphate-buffered saline (PBS; 1X), cells were fixed in 4 % Paraformaldehyde (PFA) for 10 min. After fixation and three 5 min washes with PBS, cells were permeabilized with 0.2 % Triton X-100 in PBS (PBS-T) for 10 min. After 5 min washes with PBS, non-specific binding was prevented by blocking with 3 % Bovine Serum Albumin (BSA) in 1X PBS (2 h at room temperature). Primary antibody raised against TRPM7 (ab85016, Abcam) was applied overnight at room temperature with 3 % BSA in 1X PBS. After three 5 min washes with PBS-T, cells were incubated with Alexafluor 488 donkey anti-mouse IgG (Santa Cruz) secondary antibody (1:800 in 3 % BSA) for 1 h. Nuclei were labelled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma; 1:1000 in PBS 1X). Slides were mounted with Fluorsave (Calbiochem) and examined under a Zeiss AxioStar-Plus microscope. Images were collected with a Zeiss $100 \times$ objective.

Cell surface biotinylation

Cell surface biotinylation was performed as previously described [28]. Cells were grown in serum-free medium overnight. Culture medium was removed and cells were washed three times with PBS (1X plus 0.1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂) and once with PBS (1X). Cells were then exposed to sulfo-NHS-SS-biotin for 30 min on ice, rinsed twice with BSA quenching buffer (1 % BSA in PBS 1X, pH 7.4) and incubated 10 min in the same buffer. Cells were scraped in PBS (pH 7.4) and centrifuged at 2400 rpm (6 min, 4 °C). Cell pellets were suspended in RadioImmunoPrecipitation Assay buffer (RIPA) plus anti-proteases and incubated for 30 min on ice. The resulting lysates were centrifuged at 16,000g for 15 min at 4 °C and total cellular protein content was determined using Lowry's method

[47]. The supernatants were incubated with streptavidin beads overnight at 4 °C. After a brief centrifugation, supernatants were removed and the beads were washed four times in RIPA. Biotinylated proteins were eluted from streptavidin beads using 5X sample buffer containing 2-mercaptoethanol to cleave the NHS-SS-biotin. Biotinylated proteins (membrane proteins) and eluated proteins (non biotinylated proteins) were probed to assess TRPM7 expression using western blot experiments (mouse monoclonal anti-TRPM7, 1:200, N-17, sc-19562; Santa Cruz Biotechnology, USA). For normalization and to assess the membrane protein enrichment, Na⁺/K⁺-ATPase (a1 isoform) expression was assessed on the same blots, probed with a mouse monoclonal antibody (1:200, clone 9-A5, Santa Cruz Biotechnology, USA). For the detection of TRPM7 and Na⁺/K⁺-ATPase, the secondary antibody was anti-mouse (1:20,000; abcam ab6820). Experiments were performed twice with two different cultures.

STRING query of TRPM7's interaction network

The potential interactions of TRPM7 were evaluated using the online Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Protein (STRING 9.0, http://string-db.org) to predict both direct and indirect interactions [57]. The confident scoring of the interactions were based on known and predicted protein interactions collected from direct (physical) and indirect (functional) associations. The score was set at 0.7 to represent a high confidence level. The database quantitatively integrates interaction data from four sources-genomic context, high-throughput experiments, coexpression and previous knowledge from research publications. The results are presented with the input protein (in this case TRPM7) in the context of a graphical network of interaction partners. Associations in STRING are provided with a probabilistic confidence score, which represents an estimate of how likely a given association describes a functional linkage between two proteins. The computed score indicates a high confidence when more than one type of information supports the association (direct physical interactions, text mining or experimental).

Statistics

Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between experimental groups were evaluated by a two-tailed unpaired Student's *t* test. p < 0.05 was considered statistically significant (*), p < 0.001 was considered very statistically significant (**) and p < 0.0001 was considered highly statistically significant (***).

Results

Measurements of $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR or G551D-CFTR

HeLa cells stably expressing WT-CFTR, ΔF508-CFTR and G551D-CFTR were previously described regarding CFTR expression and function [45, 57]. $[Mg^{2+}]_i$ was measured using Mag-fura-2-AM, an intracellular Mg²⁺ indicator that is ratiometric and UV light-excitable [59-61]. Measurements were performed at 37 °C because at room temperature cells did not stick in the wells and because this temperature was physiologically relevant. As shown in Fig. 1, the statistical analysis indicates that $[Mg^{2+}]_i$ is significantly lower in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR compared to those expressing WT-CFTR. Furthermore, the levels of $[Mg^{2+}]_i$ in the cells expressing the mutated CFTR were close to that observed in NT Hela cells. [Mg²⁺]_i was also significantly lower in cells expressing G551D-CFTR compared to those expressing Δ F508-CFTR.

Detection and quantitation of TRPM7's mRNA and protein

Basal TRPM7 mRNA expression was assessed in NT, WT-CFTR, Δ F508-CFTR and G551D-CFTR cells. As shown in Fig. 2a (left panel), a single PCR amplicon (200 bp) was observed indicating that endogenous TRPM7 was relatively abundant in all four cell-lines. No signal was observed in the negative control. A control, G3PDH, was also amplified by PCR (with an amplicon of 121 bp) in the same samples and showed no variation in signal intensity



Fig. 1 Ratiometric measurement of $[Mg^{2+}]_i$. $[Mg^{2+}]_i$ was estimated using Mag-Fura-2-AM in NT cells and in WT-CFTR, Δ F508-CFTR or G551D-CFTR cells. The *bar chart* represents the result of the statistical analysis (n = 6) and shows that $[Mg^{2+}]_i$ is significantly lower in F508del-CFTR and G551D-CFTR experiments compared to comparable levels in cells expressing WT-CFTR or NT cells. Furthermore, $[Mg^{2+}]_i$ is significantly lower in cells expressing G551D-CFTR compared to those expressing Δ F508-CFTR. Statistical analysis was performed with results obtained from three different cell cultures

Deringer



Fig. 2 Expression of TRPM7. **a** The *left image* shows (1) the molecular weight marker and an example of representative PCR amplicons for TRPM7 (200 bp) in Hela cells (2) not transfected, or transfected with (3) WT-CFTR, (4) Δ F508-CFTR or (5) G551D-CFTR. (6) is the negative control. The *right bar* chart is the quantitative analysis of *TRPM7* gene expression, determined by quantitative PCR in each cell line. Data were analyzed by using Δ Ct (target—reference) methodologies [28] with no differences observed between cells lines. **b** The *left image* shows representative

(not shown). TRPM7 mRNA expression was quantified by qPCR and no differences between the cells were observed (Fig. 2a, right panel).

Western blots were performed using whole cell lysates to detect the basal expression of TRPM7 protein (212 kDa, Fig. 2b, left panel) in the cell-lines. TRPM7 protein was observed in all four cell-lines. Statistical analysis showed some differences between TRPM7 protein levels between the cells, after normalization with an internal control, G3PDH (37 kDa), or total protein (Fig. 2b, right panel). The levels of TRPM7 protein were significantly higher in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR compared to cells expressing mutated CFTR. Lower levels of TRPM7 protein were observed in cells expressing WT-CFTR or G551D-CFTR when compared to NT cells. This difference was not found in cells expressing Δ F508-CFTR.

Cellular localization of TRPM7

Cellular localization of TRPM7 using a specific primary antibody was performed in NT cells and in cells expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR and G551D-CFTR (Fig. 3). First, negative controls in which the anti-TRPM7 antibody

🖄 Springer

immunodetection experiments of the TRPM7 protein (212 kDa) in Hela cells (1) not transfected, or expressing (2) WT-CFTR, (3) Δ F508-CFTR or (4) G551D-CFTR. Statistical analysis (*right*) shows that the expression of TRPM7 is increased in both Δ F508-CFTR and G551D-CFTR experiments compared wildtype assays. Nevertheless, there is less TRPM7 protein in cells expressing G551D-CFTR compared to those expressing Δ F508-CFTR. Furthermore, TRPM7 expression is decreased in cells expressing WT-CFTR compared to NT cells (n = 6)

was omitted were performed in order to show the specificity of the labelling (Fig. 3a–d). Whereas the membrane localization of TRPM7 was likely not observed in NT cells (Fig. 3e–g), the protein was observed at the plasma membrane in the cells expressing WT-CFTR (Fig. 3h–j) and Δ F508-CFTR (Fig. 3k–m) despite a less strong labelling in these latest cells. As in all cell types, the protein was observed throughout the entire cell with a vesicular pattern in G551D-CFTR cells, with no labelling at the membrane (Fig. 3n–p). The membrane localization of TRPM7 was thus increased in WT-CFTR, decreased in Δ F508-CFTR and absent in membranes of cells expressing G551D-CFTR. Nevertheless, the protein was observed throughout the entire cell with a vesicular pattern in all cell lines.

To further confirm our findings regarding the localization of TRPM7, biotinylation experiments were performed (Fig. 4) [28]. Membrane proteins were biotinylated and TRPM7 expression was assessed by western blottings (Fig. 4a). In order to show the enrichment of the membrane proteins within the biotinylated fractions, Na⁺/K⁺-ATPase detection was performed. It was observed that the expression of TRPM7 is higher in cells expressing WT-CFTR and Δ F508-CFTR than in NT cells. The expression was found to be lower in Δ F508-CFTR than in WT-CFTR cells. The



Fig. 3 Cellular localization of TRPM7. Immunofluorescence was performed to localize TRPM7 in NT cells (**a**, **e**, **f**, **g**) and in cells expressing WT-CFTR (**b**, **h**, **i**, **j**), Δ F508-CFTR (**c**, **k**, **l**, **m**) and G551D-CFTR (**d**, **n**, **o**, **p**). First, negative controls in which first antibody is omitted shows the specificity of the labelling (**a**, **b**, **c**, **d**). Vesicular labelling in the cytoplasm is observed in all four cell types;

however, membrane localization is mostly seen in cells expressing WT-CFTR (**i**, **j**) and Δ F508-CFTR (**l**, **m**). This membrane localization is likely not observed in NT cells (**f**, **g**). The labelling is less visible in Δ F508-CFTR (**l**, **m**) and lost in G551D-CFTR cells (**o**, **p**). Nuclei were DAPI stained (*blue*, **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **h**, **i**, **j**, **k**, **l**, **m**, **n**). Images were collected with a 100× objective. *Bars* represent 10 µm

lowest expression of TRPM7 was observed in the membrane of cells expressing G551D-CFTR. Despite no statistical analysis was done because of the low number of experiments (n = 2), bar charts were drawn (Fig. 4b).

After normalization by Na^+/K^+ -ATPase expression, the densitometric analysis of the TRPM7 bands showed that the membrane localization of the protein was consistent with the results obtained by immunofluorescence.

2 Springer

3358



Fig. 4 Detection of TRPM7 within membranes by biotinylation experiments. a Representative immunoblots showing the detection of TRPM7 and Na⁺/K⁺-ATPase in NT (1), WT-CFTR (2), Δ F508-CFTR (3) and G551D-CFTR (4) cells, in biotinylated surface proteins and in non biotinylated proteins (Eluates). TRPM7 is present in the membrane fraction whereas it is likely not observed in non biotinylated proteins. The *lower panel* showing the presence of a specific membrane protein (Na⁺/K⁺-ATPase) in the biotinylated fractions indicates that membrane proteins were enriched in the cell surface expression of TRPM7 after normalization by Na⁺/K⁺-ATPase. The level of TRPM7 is higher in the membranes of WT-CFTR and Δ F508-CFTR cells than in NT and G551D-CFTR cells

Function and regulation of TRPM7

The native function of TRPM7 channels in the plasma membrane was assessed by recording of whole-cell currents in NT cells and in cells expressing WT-CFTR, ΔF508-CFTR and G551D-CFTR (Fig. 5). Activation of endogenous TRPM7-mediated currents was obtained by a voltage ramp (-100 to +100 mV in 50 ms intervals) and was used to determine current-voltage relationships. I-V relationships were determined at the time point when current magnitude reached maximum for each cell, with an internal Mg^{2+} free solution. *I–V* curves were drawn after normalization of the currents by cell capacitances. From the I-V curves (Fig. 5a, left panel) it was observed that TRPM7 channel function is drastically reduced in cells expressing mutant CFTR when compared to that of NT cells or to those expressing WT-CFTR. Currents in G551D-CFTR cells were weaker than those measured in cells expressing Δ F508-CFTR. Statistical analysis was performed and is presented as bar chart (Fig. 5a, right panel). Whereas currents are similar in NT and WT-CFTR cells, they were significantly decreased in cells expressing ΔF508-CFTR and G551D-CFTR. A difference was observed between cells expressing the mutated CFTR with lower currents in G551D-CFTR cells than in Δ F508-CFTR

cells. TRPM7 is inhibited by Mg^{2+} [48]. Therefore, inhibition was induced by adding 200 µM Mg^{2+} in the intracellular solution, and *I–V* curves were recorded and compared to those obtained without divalent ions (Fig. 5b, left panel). It was observed that the presence of Mg^{2+} inhibited TRMP7 currents in NT cells as well as in cells expressing WT-CFTR. No effect was seen in Δ F508-CFTR or G551D-CFTR experiments. Statistical analysis (Fig. 5b, right panel) showed that 200 µM Mg^{2+} inhibited TRPM7 in NT and WT-CFTR cells and had no effect in the cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR. The latter results suggested that TRPM7 regulation by intracellular Mg^{2+} is altered in cells expressing mutant CFTR.

Modulation of TRPM7 channel function by Mg-ATP, Naltriben and Carvacrol

Outward currents at +80 mV were recorded, and curves were drawn after normalization to cell sizes and plotted against time. Inhibition and activation of TRPM7 were achieved by using 500 µM Carvacrol and 50 µM Naltriben in cells expressing WT-CFTR, respectively. The drugs were applied 100 s after the start of the experiments (Fig. 6a). Activation was performed and observed in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR, as currents were already very low when compared to those observed in WT-CFTR experiments (Fig. 6b, c, respectively). These results indicated that the recorded currents were due to TRPM7, which is consistent with previous reports [53-56]. Nevertheless, due to lower basal currents in ∆F508-CFTR and G551D-CFTR experiments, the effect of Naltriben was lower when compared to cells expressing WT-CFTR. The measurements presented in Fig. 5 also confirm that the function of TRPM7 is altered when mutant CFTR is expressed in cells.

Mg-ATP is requested to measure the Cl⁻ channel activity of CFTR [19, 36] and also inhibits TRPM7 [38]; therefore, the effects of Carvacrol and Natrilben in cells expressing WT-CFTR were assessed in the presence of intracellular Mg-ATP (Fig. 7). The same conditions were used as the previous set of experiments (see Fig. 6), except that 5 mM Mg-ATP was present in the intracellular solution. Figure 7a shows the time course of the currents with or without Mg-ATP in the intracellular buffer. It is observed that Mg-ATP inhibited TRPM7 activity in WT-CFTR experiments as expected. Furthermore, inhibition and activation of TRPM7 by Carvacrol and Natrilben, respectively, were obtained in cells expressing WT-CFTR in the presence of Mg-ATP, (Fig. 7b, c). However, the action of the drugs was lowered by decreased TRPM7 function due to the presence of 5 mM Mg-ATP in the intracellular solution. Figure 8 shows the activation and the inactivation of TRPM7 in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR in the presence of 5 mM Mg-ATP. Figure 8a (upper panel)



Fig. 5 Function and regulation of TRPM7. Patch-clamp analysis was performed in NT Hela cells and in cells expressing, WT-CFTR, Δ F508-CFTR or and G551D-CFTR. **a** The *left panel* shows example current-voltage (I-V) relationships for TRPM7 channels obtained in the four cell lines with Mg²⁺-free intracellular solution. *I–V* relationships were taken at the time point when current magnitude reached maximum for each cell. Statistical analysis was performed using the pA/pF values taken at 100 mV and are presented as *bar chart* (*right panel*). Whereas currents are similar in NT and WT-CFTR cells, they were significantly decreased in Δ F508-CFTR and

shows the time course of Δ F508-CFTR-induced currents, with or without Mg-ATP in the intracellular buffer, and it was deduced that Mg-ATP inhibited TRPM7 activity in the presence of mutant CFTR. Figure 8a (lower panel) shows that TRPM7 was activated and inactivated in the presence of Naltriben and Carvacrol, respectively, despite the presence of Mg-ATP in the intracellular solution. In Fig. 8b (upper

G551D-CFTR cells. A difference is also observed between cells expressing the mutated CFTR. The currents are significantly lower when in G551D-CFTR cells than in Δ F508-CFTR cells. **b** Comparison of the *I*-*V* relationships for TRPM7 channels in the four cell lines, with 200 μ M Mg²⁺ and without Mg²⁺ in the intracellular solution (*left panel*). *Bar chart (right panel*) shows that whereas the function of TRPM7 is inhibited by Mg²⁺ in NT and WT-CFTR cells, no inhibition is observed in the cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR

panel), it was observed that TRPM7 currents in cells expressing G551D-CFTR were poorly inhibited by Mg-ATP in the intracellular buffer. Once again, TRPM7 was activated in this mutant cell-line in the presence of Naltriben, despite the presence of Mg-ATP in the intracellular solution (Fig. 8b, lower panel). Inactivation by Carvacrol was lower than in Δ F508-CFTR cells.

Deringer

Fig. 6 Modulation of TRPM7 function in the absence of intracellular Mg^{2+} . The temporal development of TRPM7 currents were extracted from individual ramp current recordings by measuring current amplitudes at a voltage of +80 mV. a (upper panel) Curve showing time-dependent currents measured in the absence of intracellular ${\rm Mg}^{2+}$ (black) and in the presence of Carvacrol (grey) in cells expressing WT-CFTR. The inhibitory effect of Carvacrol is observed. a (lower panel). Curve showing time-dependent currents measured in the absence of intracellular Mg²⁺ (black) and in the presence of Naltriben (grey) in cells expressing WT-CFTR. Activation of TRPM7 is observed. b Curve showing time-dependent currents measured in the absence of intracellular Mg^{2+} (*black*) and in the presence of Naltriben (grey) in cells expressing ΔF508-CFTR. Activation of TRPM7 is observed. c Curve showing time-dependent currents measured in the absence of intracellular Mg²⁺ (black) and in the presence of Naltriben (grey) in cells expressing G551D-CFTR. Activation of TRPM7 is observed. The curves presented in **a**, **b** and **c** are the mean curves of three cells from three different cell cultures



Measurement of CFTR channel function in the presence of Naltriben

CFTR function was measured by patch-clamping in cells expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR or G551D-CFTR (*n* = 3 cells from four different cell cultures for each cell

🖄 Springer

type). Activators (FSK and GST) and inhibitor (Inhibitor 172) of CFTR were used to ensure the specificity of the recordings (Fig. 9a). Figure 9b shows the normalized I-V curve obtained in WT-CFTR experiments, in the presence of either Naltriben or Carvacrol. It was observed that TRPM7 inhibition had no effect on CFTR function,

Fig. 7 Modulation of TRPM7 function in WT-CFTR experiments, in the presence of 5 mM Mg-ATP. The same conditions as in Fig. 5 were used except that 5 mM Mg-ATP was present in the intracellular solution. a Time course of currents with (grey) or without (black) Mg-ATP in the intracellular buffer. Mg-ATP inhibited TRPM7 activity in cells expressing WT-CFTR. The inlet shows the initial decrease of currents due to Mg-ATP, whereas in the absence of Mg ATP the initial currents increase. b Inhibition of TRPM7 by Carvacrol (grey). c Activation of TRPM7 by Natrilben



whereas TRPM7 activation by Naltriben led to decreased WT-CFTR channel function (Fig. 9b). A significant decrease in WT-CFTR function (-26 %) was observed in the presence of Naltriben, but no significant effect was detected by the addition of Carvacrol (Fig. 9c). For cells expressing Δ F508-CFTR (Fig. 10), *I*–V curves which were obtained in the presence of Naltriben and showed a significant decreased function of the mutated protein (Fig. 10a). This decreased function was more important than that of the specific inhibitor 172 (-39.8 %, Fig. 10b). I-V curves were also obtained in the presence of Naltriben in cells expressing G551D-CFTR (Fig. 11). I-V curves showed that Naltriben activated the function of G551D-CFTR and that this activation was higher than that of the addition of FSK plus GST. Indeed, a significantly increased chloride channel activity of G551D-CFTR (+824.2 %) was observed (Fig. 11b).

Measurements of Ca²⁺ influx through TRPM7

TRPM7 channel conductance was monitored using a FlexStation 3 scanning fluorometer to monitor the Ca²⁺-independent (360-nm excitation/510-nm emission) fura-2 quenching by Mn²⁺ in cells, as previously described [62]. As shown in Fig. 12a, the curves representing Ca²⁺ influx which were measured in all the cell types (n = 6 for each cell type), presented some differences among the cell types. Bar charts (Fig. 12b) were drawn using the average slope values of the quenching. Quenching rates were not different in WT-CFTR and NT cells. Ca²⁺ influx through TRPM7 was lower in cells expressing Δ F508-CFTR than in WT-CFTR cells. At the opposite, it was increased in the cells expressing G551D-CFTR. Whereas, Waixenicin A had no significant effect upon the quenching rates, Naltriben

🖄 Springer

Fig. 8 Activation of TRPM7 function in cells expressing either AF508-CFTR or G551D-CFTR, in the presence of 5 mM Mg-ATP. The same conditions as in Fig. 5 were used except that 5 mM Mg-ATP was present in the intracellular solution. a (upper panel) Time course of currents in cells expressing F508del-CFTR, with (grey) or without (black) Mg-ATP in the intracellular buffer. Mg-ATP inhibited TRPM7 activity in F508del-CFTR experiments. a (lower panel) TRPM7 is activated and inhibited in the presence of Naltriben or Carvacrol, respectively, despite the presence of Mg-ATP in the intracellular solution, b (upper panel). Time course of currents in cells expressing G551D-CFTR, with (grey) or without (black) Mg-ATP in the intracellular buffer. Mg-ATP failed to inhibit TRPM7 activity in these cells. **b** (*lower panel*) TRPM7 is activated and poorly inhibited by Naltriben or Carvacrol, respectively in cells expressing G551D-CFTR, despite the presence of Mg-ATP in the intracellular solution



significantly increased the Ca²⁺ influx in cells expressing Δ F508-CFTR when compared to non-treated Δ F508-CFTR cells. The same recordings, using the same conditions as for Hela cells were performed in native HEK293 cells (n = 13). The quenching curves are presented in Fig. 12c (upper panel). The statistical analysis was performed and is presented as bar charts in Fig. 12c

(lower panel). In these cells, a significant activation and inhibition of the Ca²⁺ influx through TRPM7 was obtained by the use of Naltriben (n = 10) and Waixenicin A (n = 6), respectively. This indicates that the absence of modulation observed in the Hela cells expressing WT-CFTR is likely due to the cell types and is not due to technical artifacts.

Deringer

Fig. 9 Inhibition of WT-CFTR currents by Naltriben. a I-V curves (normalized by cell capacitance pF, mean \pm SEM) for CFTR currents in WT-CFTR expressing cells, with 5 mM Mg-ATP in the intracellular buffer. CFTR was activated by FSK and GST, and inhibited by CFTR inhibitor 172, indicating that the recorded currents were due to CFTR. b Curves obtained in the presence of Naltriben and Carvacrol were plotted. Naltriben and Carvacrol activates and inhibites CFTR, respectively. c Bar chart showing the statistical analysis of the currents noted at +80 mV indicating that WT-CFTR function is decreased in the presence of Naltriben



Prediction of the protein-protein interaction network of TRPM7

The interaction network of TRPM7 was evaluated with the online Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/ Protein to predict both direct and indirect interactions [54]. As shown in Fig. 13, based on bibliographic analysis, putative interacting partners of TRPM7 were found to be annexin A1 (ANXA1, score: 0.925); myosin heavy chain 9 (non-muscle, MYH9, score: 0.910); kininogen 1 (KNG1, score: 0.885); transient receptor potential cation channel 5, subfamily V, member 5 (TRPV5, score: 0.869); transient receptor potential cation channel 6, subfamily VI, member 6 (TRPV6, score: 0.859); myosin heavy chain 10 (non-

 $\underline{\textcircled{O}}$ Springer

Fig. 10 Inhibition of AF508-CFTR currents by Naltriben. a I-V normalized curves for CFTR currents in cells expressing Δ F508-CFTR (whole-cell configuration with 5 mM Mg-ATP in the intracellular buffer) in the presence or absence of Naltriben. CFTR was activated by FSK and GST and inhibited by CFTR inhibitor 172, indicating that the recorded currents were due to CFTR. The inhibition by Naltriben is more efficient than that of inhibitor 172. b Bar chart showing the statistical analysis of currents (+80 mV) indicating that Δ F508-CFTR function is decreased by Naltriben



muscle, MYH10, score: 0.853); transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1, (VR1, score: 0.834); transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1, score: 0.832); transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 (TRPV4, score: 0.832); and phospholipase C (beta 1, PLCB1, score: 0.836). Biochemical evidence was only depicted for annexinA1 (ANXA1), myosin heavy chain 9 (MYH9), myosin heavy chain 10 (MYH10) and phospholipase C beta 1 (PLCB1). ANXA1 is a Calcium/ phospholipid-binding protein which promotes membrane fusion and is involved in exocytosis. It also regulates phospholipase A2 activity. MYH9 and MYH10 are non-muscle cellular myosins that play a role in cytokinesis, cell

2 Springer

shape and secretion. PLCB1 which is phosphoinositidespecific, catalyzes the formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol from phosphatidylinositol 4,5bisphosphate. This reaction uses calcium as a cofactor and plays an important role in the intracellular transduction of many extracellular signals.

Discussion

Magnesium ions, being one of the most abundant intracellular cations present at a cellular molar concentration of 1×10^{-2} [59], are essential for a wide variety of biochemical reactions and physiological functions. Mg²⁺ is Fig. 11 Activation of G551D-CFTR currents by Naltriben. a I-V normalized curves for CFTR currents in cells expressing G551D-CFTR (with 5 mM Mg-ATP in the intracellular buffer) plus Naltriben. CFTR was activated by FSK and GST, and inhibited by CFTR inhibitor 172, indicating that the recorded currents were due to CFTR. The activation by Naltriben is more efficient than that of FSK plus GST. b Bar chart showing the statistical analysis of currents (+80 mV) indicating that G551D-CFTR function is very significantly increased by Naltriben



especially important for enzymes that require nucleotides (e.g. kinases, G-proteins and ATPases), as the biologically active form of ATP is the Mg-ATP complex. $[Mg^{2+}]_i$ is known to regulate the expression of CFTR. Knowing that a decrease in $[Mg^{2+}]_i$ leads to reduced opening and closing rates of the CFTR channel [34], we first estimated the Mg^{2+} content of cells expressing WT-CFTR, and Δ F508-CFTR and G551D-CFTR mutants. The Δ F508 and G551D mutations were chosen because once mutant proteins reach plasma membranes, they exhibit decreased and altered Cl⁻ channel function, independently of their membrane localisation [14–16]. We observed a decreased $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing Δ F508-CFTR or G551D-CFTR compared to that of cells expressing WT-CFTR. The effects of changes in the concentration of free Mg²⁺ on the activity of CFTR Cl⁻ channels were previously investigated and it was shown that Mg²⁺ facilitates ATP binding that opens the CFTR channel [36]. Indeed, in an excised inside-out membrane patch experiment, removing Mg²⁺ from the cytosolic solution reduced, but did not abolish, CFTR activity and addition of Mg²⁺ restored the Cl⁻ currents. Therefore, altered levels of [Mg²⁺]_i in cells expressing mutant CFTR could explain, at least in part, the observed altered Cl⁻ channel functions related to some mutations of

Deringer

3366



Fig. 12 Measurements of Ca^{2+} influx through TRPM7. a Example of quenching curves showing the Ca^{2+} influx which were measured in all the cell types. The *upper panel* shows a set of curves obtained in the absence and in the presence of TRPM7 activator. The *lower panel* shows the curves obtained without and in the presence of TRPM7 inhibitor. **b** *Bar charts* show the average slope values of the quenching, taken at the 300 s time point. A significant difference was observed among the different cell types. Without any modulator of TRPM7, the quenching rate was significantly higher in G551D-CFTR than in WT-CFTR or NT cells. At the contrary, the quenching rate

CFTR. This hypothesis is reinforced by the fact that we saw less Mg^{2+} in cells expressing G551D-CFTR than in those expressing Δ F508-CFTR. This decreased $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR can be correlated to the described specific alterations in the channel function mediated by these two mutants [14-17, 36, 45, 58]. It was also observed that $[Mg^{2+}]_i$ is higher in cells expressing WT-CFTR compared to NT cells. This latter point led us to postulate that CFTR itself is likely involved in the regulation of intracellular Mg^{2+}, as it does for Ca²⁺ regulation [32]. Nevertheless, this hypothesis requires further evidence for its validation.

Deringer

was lower in cells expressing Δ F508-CFTR than in WT-CFTR, G551D-CFTR and NT cells. Whereas, the TRPM7 inhibitor Waixenicin A had no significant effect upon the quenching rates, Naltriben significantly increased the quenching rate in cells expressing Δ F508-CFTR. c Ca²⁺ influx through TRPM7 was measured in HEK293 cells. The *upper panel* shows an example of quenching curves obtained without and with modulation of TRPM7. The *lower panel* shows the corresponding *bar charts* indicating that Naltriben and Waixenicin A significantly activates and inhibits TRPM7, respectively

 $[Mg^{2+}]_i$ is finely regulated by precise mechanisms that balance Mg^{2+} uptake, intracellular Mg^{2+} storage and Mg^{2+} efflux. Whereas extremely slow turn-over of Mg^{2+} across the cell plasma membrane under quiescent conditions is described, some efforts have been made to identify and characterize the complex network of Mg^{2+} -specific transporters (for review [61]). The main vertebrate Mg^{2+} cellular transporters identified are Ancient Conserved Domain Protein (Acdp2) [63]; Magnesium Transporter 1 (MagT1) [64]; Mitochondrial RNA splicing 2 protein (Mrs2) [65]; Claudin 16 [66]; SoLute Carrier family (SLC41A1 and A2) [67, 68]; TRPM6 [69]; and TRPM7 Fig. 13 Network of predicted interactions for TRPM7 obtained by STRING. *Blue connecting lines* indicate that the interaction/s are mentioned in PubMed abstracts. Interactions with Annexin A1 (ANXA1), myosin heavy chain 9 non-muscle (MYH9), myosin heavy chain 10 non-muscle (MYH10) and phospholipase C beta 1 (PLCB1) were given due to experimental data. Scores were set above 0.7 for high confidence



[38, 42]. We focused our study on the ubiquitous TRPM7 chanzyme, which is presented as the main $[Mg^{2+}]_i$ regulator of [41].

The quantitative mRNA analysis of TRPM7 showed that there was no difference in the presence or absence of CFTR within cells or when mutant CFTR is expressed. Therefore, the gene expression of TRPM7 itself is unlikely involved in the $[Mg^{2+}]_i$ differences that were observed. The quantitation of TRPM7 protein levels in the cells was surprising when it was correlated to the measured $[Mg^{2+}]_i$. Indeed, low $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR corresponded to high levels of TRPM7 protein expression. By contrast, high $[Mg^{2+}]_i$, which was observed in WT-CFTR experiments, correlated well to a low amount of protein. Thus, we hypothesized that the cellular localization, function, and regulation of the TRPM7 channel could be involved in the decreased $[Mg^{2+}]_i$ in the cells expressing mutant CFTR.

Immunofluorescence and biotinylation experiments showed a vesicular labelling in the cytoplasm in all three cell types, with membrane expression being mostly seen in WT-CFTR experiments. Membrane localization was lower in cells expressing Δ F508-CFTR and likely absent when G551D-CFTR was expressed. These results are consistent with previously described studies [37, 41, 70, 71]. Furthermore, it was reported that TRPM7 can be translocated within cells in response to external stimulation. For example, TRPM7 accumulates within cells in response to an increased fluid flow and is localized at the plasma membrane in physiological condition, in <100 s [70]. In our experiments, the cellular modifications due to the CFTR mutations could explain the altered membrane localization of TRPM7. Furthermore, the altered membrane localization of TRPM7 in Δ F508-CFTR and mostly in G551D-CFTR cells could fully explain the decreased [Mg²⁺]_i in these cells.

Although the decreased membrane localization of TRPM7 in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR is sufficient to explain decreased [Mg²⁺]_i, we studied its channel function. We observed that TRPM7 channel activity was decreased and almost abolished in Δ F508-CFTR and G551D-CFTR experiments, respectively. TRPM7 regulation by increasing Mg²⁺ was also evaluated according to previous studies [41–44] and we found that it did not respond in cells containing mutant CFTR. As in our cell model, amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease are epidemiologically linked to a severe deficiency in Mg²⁺ [72]. In these disorders, a TRPM7 variant was found in some patients that produces a protein with a missense mutation (T1482I). Further

🖄 Springer

analysis indicated that a recombinant T1482I-TRPM7 mutant exhibited the same kinase catalytic activity as wildtype TRPM7, with an increased sensitivity to inhibition by intracellular Mg^{2+} [69]. Therefore, in our study the kinase activity of the alpha-kinase domain fused to the ion channel moiety of TRPM7 (for review, [44]) is unlikely to be involved in altering channel function and regulation. The functional interaction between the TRPM7 channel and kinase activity is poorly understood, although it has been shown that TRPM7 kinase activity is not essential for channel activation [39]. Nevertheless, it is also reported that the kinase activity of TRPM7 plays a role in modulating channel activity and that it is itself affected by Mg²⁺ availability [41, 42, 44]. Thus, we propose that a vicious circle occurs in cells expressing mutant CFTR in which altered TRPM7 function leads to a decrease in $[Mg^{2+}]_i$, which in turn modifies the regulation of TRPM7 channel activity.

 Mg^{2+} coordinates the γ phosphate of ATP and is required for hydrolysis by most enzymes [73]. Indeed, chelating Mg^{2+} abolishes ATP hydrolysis [32], which is necessary for CFTR channel function [19, 35]. Therefore, we hypothesized that the altered activity of TRPM7 presented here is linked to modifications in the function of Δ F508-CFTR and G551D-CFTR and we speculated that restoring TRPM7 function could play a positive role in the activity of CFTR. To answer this question, we performed experiments using Naltriben to activate TRPM7 [53, 54]. Whereas Mg-ATP inhibits TRPM7 [38], it has to be used in patch-clamp experiments to measure the function of CFTR [19, 36]. We performed these experiments in the presence of 5 mM Mg-ATP. This experimental condition permitting the electrophysiological recording of CFTR showed that TRPM7 was still active, despite a decreased function. CFTR Cl⁻ channel function was thus recorded in the presence of a TRPM7 activator, according to previously described whole-cell methods [45, 58]. Naltriben led to a decrease in Cl⁻ channel activity for WT-CFTR and Δ F508-CFTR. By contrast, we observed that TRPM7 activation leads to an increased G551D-CFTR channel function. CFTR is unique amongst ion channels as it is dependent not only on PKA-mediated phosphorylation, but also on ATP binding and hydrolysis [74, 75] by the nucleotidebinding domains (NBDs) which require Mg-ATP [35]. Mg-ATP was found to increase channel activity with a saturating effect above 1 mmol/l [76]; however, it was observed that whole-cell CFTR Cl⁻ currents (activated by FSK) were diminished by increasing the cytosolic free Mg²⁺ level, even when maintaining Mg-ATP in the cytosol above millimolar concentrations [77]. This could explain why activation of TRPM7 leads to decreased CFTR function in cells expressing WT-CFTR and Δ F508-CFTR. In G551D-CFTR experiments, [Mg²⁺]_i is much lower

Description Springer

compared to cells expressing either WT-CFTR or Δ F508-CFTR and TRPM7 is poorly present in membranes were it exhibits very weak channel activity. Therefore, it can be postulated that the activation of TRPM7 by Naltriben leads to increased [Mg²⁺]_i that remains below the inhibitory level for CFTR. Therefore, we show here for the first time that Naltriben is a new potentiator of the G551D-CFTR mutant protein. The presented negative effect of Naltriben on the function of Δ F508-CFTR was also reported for other potentiators such as VX-770 (Ivacaftor, [78]). Indeed, whereas VX-770 treatments rescue G551D CFTR function, it inhibits functional rescue of Δ F508 CFTR and reduces the membrane stability of WT-CFTR.

The role of TRPM7 upon CFTR function is unlikely due to $[Mg^{2+}]_i$ modulation alone, but may also involve protein– protein interactions and/or the serine/threonine protein kinase domain at the distal C-terminus. Indeed, the C-terminus of TRPM7 contains a TRP box (~25 highly conserved residues) that may interact with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂, for review [79]), which activates CFTR in the complete absence of Mg^{2+} [80]. Knowing that the kinase domain of TRPM7 also shows some similarity to cAMP-dependent PKA which also activates CFTR [18, 19], TRPM7 may act on CFTR in many ways involving a multitude of protein interactions. Amongst the proteins predicted to interact with TRPM7, biochemical evidence was only identified for ANXA1, MYH9, MYH10 and PLCB1. MYH and PLCB1 were shown to be involved in CFTR localization and/or function [81, 82]. Thus, it is clear that further experiments are required to ascertain whether altered TRPM7 function and regulation acts upon mutant CFTR or whether the converse interaction occurs.

Beside protein-protein interactions, Ca²⁺ is more likely involved in the altered function and regulation of TRPM7 in CF cells, for at least three reasons. First, it was previously described that TRPM7 channels are inhibited by intracellular Ca²⁺ [37-39, 44, 71, 83]. Second, a larger mobilization of Ca²⁺ ions in CF bronchial epithelial cells is well described [29-33, 84]. Third, the implication of other TRP channels (TRPV5 and TRPV6) [82] in the increase of Ca²⁺ influx in CF bronchial epithelial cells were studied and it was shown that this increase is mostly due to an upregulation of TRPV6 activity. Therefore, we propose that the altered function and regulation of TRPM7 presented here are due to an increase in Ca^{2+} influx in Δ F508-CFTR cells. This is reinforced by our findings where decreased $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing mutant CFTR is not involved in the altered function of TRPM7. In order to assess our hypothesis, we measured Ca²⁺ influx via TRPM7 in cells expressing WT-CFTR, ΔF508-CFTR and G551D-CFTR. The Ca²⁺ conductance of TRPM7 has been previously measured using fluorescent cation binding dyes [43],
commonly using the ratiometric properties of the Ca²⁺ binding dye fura-2 [61]. Based on its TRPM7 permeability and high fura-2 binding affinity, we used Mn^{2+} as the quenching reagent in our assay. Measuring TRPM7-mediated Mn²⁺ entry, rather than Ca²⁺, affords several advantages. First, some competing cations entry pathways [e.g., calcium-release activated calcium (CRAC) channels] are less permeable than TRPM7 to Mn²⁺. Second, CRAC channel currents can be further disconnected by avoiding Ca²⁺-deficient assay conditions, which are needed for optimal measurement of Ca²⁺ influx. Third, it allowed us to realize our experiment in the presence of physiological levels of Ca²⁺ and Mg²⁺ [43]. Because Waixenicin A (a xenicane diterpenoid from the Hawaiian soft coral S. edmondsoni) [85] inhibits TRPM7-mediated Mn2+ quench in a dose-dependent manner and because its inhibitory effect is strongly dependent on the intracellular Mg²⁺ concentration [86], it was used, due to the observed variations in [Mg²⁺]_i among our cell types. We observed a decreased and increased Ca²⁺ influx through TRPM7 in ΔF508-CFTR and G551D-CFTR, respectively. Regarding the cells expressing Δ F508-CFTR, this is in accordance with our results showing a decreased function of TRPM7 in these cells. Regarding the cells expressing G551D-CFTR, we found an increased Ca²⁺ influx via TRPM7 which was not in accordance with a decreased function of the channel. Therefore, we hypothesize that in this cell type the behaviour of TRPM7 may vary among ions. This point has to be further studied. We also noticed that the drug modulation of TRPM7 by Naltriben and Waixenicin A was difficult to detect in Hela cells. In order to show that this was not due to our experimental conditions, we performed the same experiments in HEK293 cells which have a high level of TRPM7 expression [38]. In native HEK293 cells, a modulation of TRPM7 was observed. This led us to conclude that the TRPM7 modulation was altered in Hela cells expressing a mutated CFTR and that the involvement of TRPM7 in constitutive Ca²⁺ influx is different among cell types. This cell-dependent contribution in constitutive Ca²⁺ currents due to TRPM7 was previously suggested [87]. Indeed, it was reported that it can be difficult to detect Ca²⁺ influx mediated by TRPM7 in some cells because its contribution can be small, relative to the large variety of constitutive currents [43, 88]. Our conclusion is that TRPM7 is likely not involved in the large Ca²⁺ influx described in cells expressing Δ F508-CFTR and that the described [Ca²⁺]_i overload in these cells is likely responsible for the altered function of TRPM7. Second, we show here for the first time that Ca²⁺ influx via TRPM7 in cells expressing G551D-CFTR are increased.

We show here, for the first time, that the expression and function of TRPM7 are altered in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR (Fig. 14). We also propose



Fig. 14 Summary of results. The table presents previously published information regarding CFTR (*grey*) and the $[Mg^{2+}]_i$ and TRPM7 (*black*) results of this study in order to provide a synthetic view of the correlation between CFTR modulation and our findings

that there is a functional link between TRPM7 and CFTR via decreased $[Mg^{2+}]_i$ and increased Ca^{2+} influx in CF cells. Hypomagnesaemia has been reported as a common feature in CF patients [89]. Mean serum magnesium range in CF patients was shown to be 0.46-1.03 mmol/L whereas the normal range is 0.74-1.1 [89]. This could explain the low levels of $[Mg^{2+}]_i$ that we observed in cells expressing the mutated CFTR. Patients who receive oral magnesium present better clinical symptoms [90]. If we hypothesize that Mg²⁺ supplementation induces a decreased function of TRPM7, this could be in opposition with our results showing that its activation by Naltriben has a positive effect on the function of G551D-CFTR. Nevertheless, the mechanism of action of Mg^{2+} in pulmonology is not fully understood due to a small correlation between serum and intracellular concentrations [90]. For example, [Mg²⁺]_i in erythrocytes, mononuclear cells and granulocytes do not reflect the body's Mg²⁺ store because it is primarily concentrated in muscles and bones [91]. Therefore, we propose that the effect of supplementation may be different among the type of mutation of CFTR, which is linked to variations in the localization and function of TRPM7. Our results

🖄 Springer



Fig. 15 Diagram presenting the results and the effect of Naltriben. The three cells represent WT-CFTR, Δ F508-CFTR and G551D-CFTR experiments with their status related to $[Mg^{2+}]_i$, CFTR and

together with the improvement of the symptoms in CF by Mg^{2+} supplementation also reinforce the poor correlation between serum and intracellular concentrations of Mg^{2+} .

From a pharmacological point of view, we show here that Naltriben modifies the phenotype of CFTR-expressing cells (Fig. 15). Interestingly, the activation of TRPM7 leads to increased G551D-CFTR function; thus, we propose that Naltriben is a new potentiator for this particular mutation.

Acknowledgments We thank the association Gaëtan Salaün and the French foundation "Vaincre la Mucoviscidose" for funding the present work. We also thank Dr Mohamed Keir (Nanion Technology, Germany) for his help. We acknowledge the grant that funds the ability to provide Waixenicin A: U.S. National Institute of Health Grant P20GM 103466.

References

- Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox T, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245:1073–1080
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielinski J, Lok S, Plavsik N, Chou JL, Drumm ML,

Deringer

TRPM7. The effect of Naltriben is shown by *arrows* which indicate that the drug modifies TRPM7 activity and subsequently CFTR function

Ianuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245:1066–1073

- Zielinski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem BS, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC (1991) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. Genomics 10:214–228
- Tabcharani JA, Linsdell P, Hanrahan JW (1997) Halide permeation in wild-type and mutant CFTR chloride channels. J Gen Physiol 110:341–354
- Linsdell P, Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW (1997) Permeability of wildtype and mutant CFTR chloride channels to polyatomic anions. J Gen Physiol 110:355–364
- Hasegawa H, Skach W, Baker O, Calayag MC, Lingappa V, Verkman AS (1992) A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. Science 258:1477–1479
- Ballard ST, Spadafora D (2007) Fluid secretion by submucosal glands of the tracheobronchial airways. Respir Physiol Neurobiol 159:271–277
- Riordan JR (2008) CFTR function and prospects for therapy. Annu Rev Biochem 77:701–726
- 9. Rosenstein BJ, Zeitlin PL (1998) Cystic fibrosis. Lancet 351:277-282
- 10. Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. Lancet 361:681-689
- Amaral MD, Farinha CM (2013) Rescuing mutant CFTR: a multi-task approach to a better outcome in treating cystic fibrosis. Curr Pharm Des 19:3497–3508

- Farinha CM, Matos P, Amaral MD (2013) Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane trafficking: not just from the endoplasmic reticulum to the Golgi. FEBS J 280:4396–4406
- Okiyoneda T, Barriere H, Bagdany M, Rabeh WM, Du K, Hohfeld J, Young JC, Lukacs GL (2010) Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. Science 329:805–810
- Melin P, Norez C, Callebaut I, Becq F (2006) The glycine residues G551 and G1349 within the ATP-binding cassette signature motifs play critical roles in the activation and inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by phloxine B. J Membr Biol 208(3):203–212
- Bompadre SG, Sohma Y, Li M, Hwang TC (2007) G551D and G1349D, two CF-associated mutations in the signature sequences of CFTR, exhibit distinct gating defects. J Gen Physiol 129:285–298
- Bompadre SG, Li M, Hwang TC (2008) Mechanism of G551D-CFTR potentiation by a high affinity ATP analog. J Biol Chem 283:5364–5369
- Pasyk S, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE (2009) Direct interaction of a small-molecule modulator with G551D-CFTR, a cystic fibrosis-causing mutation associated with severe disease. Biochem J 418:185–190
- Gadsby DC, Nairn AC (1999) Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. Physiol Rev 79:S77– S107
- Sheppard DN, Welsh MJ (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. Physiol Rev 79:S23–S45
- Cormet-Boyaka E, Di A, Chang SY, Naren AP, Tousson A, Nelson DJ, Kirk KL (2002) CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex. Proc Natl Acad Sci USA 99:12477–12482
- Naren AP, Quick MW, Collawn JF, Nelson DJ, Kirk KL (1998) Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein–protein interactions. Proc Natl Acad Sci USA 95:10972–10977
- Raghuram V, Mak DD, Foskett JK (2001) Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. Proc Natl Acad Sci USA 98:1300–1305
- 23. Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ, Milgram SL (1998) An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. J Biol Chem 273:19797–19801
- Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB, Li M (2000) Accessory protein facilitated CFTR–CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. Cell 103:169–179
- Cheng J, Moyer BD, Milewski M, Loffing J, Ikeda M, Mickle JE, Cutting GR, Li M, Stanton BA, Guggino WB (2002) A Golgiassociated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. J Biol Chem 277:3520–3529
- 26. Trouvé P, Le Drévo MA, Kerbiriou M, Friocourt G, Fichou Y, Gillet D, Férec C (2007) Annexin V is directly involved in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's function. Biochim Biophys Acta 1772(10):1121–1133
- 27. Le Drévo MA, Benz N, Kerbiriou M, Gioux M, Pennec JP, Trouvé P, Férec C (2008) Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the ΔF508-cystic fibrosis transmembrane regulator. Biochim Biophys Acta 1782:605–614
- Benz N, Le Hir S, Norez C, Kerbiriou M, Calvez M-L, Becq F, Trouvé P, Férec C (2014) Improvement of chloride transport

defect by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cystic fibrosis epithelial cells. PLoS One 9(2):e88964

- Antigny F, Norez C, Becq F, Vandebrouck C (2011) CFTR and Ca²⁺ signaling in cystic fibrosis. Front Pharmacol 2:67
- Antigny F, Norez C, Cantereau A, Becq F, Vandebrouck C (2008) Abnormal spatial diffusion of Ca²⁺ in F508del-CFTR airway epithelial cells. Respir Res 9:70
- Antigny F, Girardin N, Raveau D, Frieden M, Becq F, Vandebrouck C (2009) Dysfunction of mitochondria Ca²⁺ uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells. Mitochondrion 9(4):232–241
- Antigny F, Norez C, Becq F, Vandebrouck C (2008) Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. Cell Calcium 43(2):175–183
- Norez C, Antigny F, Becq F, Vandebrouck C (2006) Maintaining low Ca²⁺ level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. Traffic 7(5):562–573
- 34. Bargon J, Trapnell BC, Chu CS, Rosenthal ER, Yoshimura K, Guggino WB, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG (1992) Down-regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression by agents that modulate intracellular divalent cations. Mol Cell Biol 12(4):1872–1878
- 35. Li C, Ramjeesingh M, Wang W, Garami E, Hewryk M, Lee D, Rommens JM, Galley K, Bear CE (1996) ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. J Biol Chem 271(45):28463–28468
- Ikuma M, Welsh MJ (2000) Regulation of CFTR Cl2 channel gating by ATP binding and hydrolysis. PNAS 97(15):8675–8680
- Vissera D, Middelbeekb J, van Leeuwenb FN, Jalink K (2014) Function and regulation of the channel-kinase TRPM7 in health and disease. Eur J Cell Biol 93(10–12):455–465
- Nadler MJ, Hermosura M, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A (2001) LTRPC7 is a Mg. ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. Nature 411(6837):590–595
- Penner R, Fleig A (2007) The Mg²⁺ and Mg²⁺-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. Handb Exp Pharmacol 179:313–328
- Middelbeek J, Clark K, Venselaar H, Huynen MA, van Leeuwen FN (2010) The alpha-kinase family: an exceptional branch on the protein kinase tree. Cell Mol Life Sci 67(6):875–890
- 41. Ryazanova LV, Rondon LJ, Zierler S, Hu Z, Galli J, Yamaguchi TP, Mazur A, Fleig A, Ryazanov AG (2010) TRPM7 is essential for Mg²⁺ homeostasis in mammals. Nat Commun 1:109
- Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurosaki T, Fleig A, Scharenberg AM (2003) Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. Cell 114(2):191–200
- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2003) TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. J Gen Physiol 121(1):49–60
- Paravicinia TM, Chubanovb V, Gudermannb T (2012) TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis. Int J Biochem Cell Biol 44(8):1381–1384
- 45. Teng L, Kerbiriou M, Taiya M, Le Hir S, Benz N, Trouvé P, Férec C (2012) Proteomic Identification of Calumenin as a G551D: CFTR associated protein. PLoS One 7(6):e40173
- Baldoli E, Castiglioni S, Maier JA (2013) Regulation and function of TRPM7 in human endothelial cells: TRPM7 as a potential novel regulator of endothelial function. PLoS One 8(3):e59891
- Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr A, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Pholin phenol reagent. J Biol Chem 183:263–275

Deringer

- Yu M, Huang C, Huang Y, Wu X, Li X, Li J (2013) Inhibition of TRPM7 channels prevents proliferation and differentiation of human lung fibroblasts. Inflamm Res 62(11):961–970
- Luo J, Zhu Y, Zhu MX, Hu H (2011) Cell-based calcium assay for medium to high throughput screening of TRP channel functions using FlexStation 3. J Vis Exp 54:e3149. doi:10.3791/3149
- Farre C, Stoelzle S, Haarmann C, George M, Brüggemann A, Fertig N (2007) Automated ion channel screening: patch clamping made easy. Expert Opin Ther Targets 11(4):557–565
- Yang YM, Jung HH, Lee SJ, Choi HJ, Kim MS, Shin DM (2013) TRPM7 is essential for RANKL-induced osteoclastogenesis. Korean J Physiol Pharmacol 17:65–71
- Chokshi R, Matsushita M, Kozak JA (2012) Patch-clamp electrophysiology. Detailed examination of Mg²⁺ and pH sensitivity of human TRPM7 channels. Am J Physiol Cell Physiol 302(7):C1004–C1011
- Chubanov V, Schäfer S, Ferioli S, Gudermann T (2014) Natural and synthetic modulators of the TRPM7 channel. Cells 3:1089–1101
- Hofmann T, Schäfer S, Linseisen M, Sytik L, Gudermann T, Chubanov V (2014) Activation of TRPM7 channels by small molecules under physiological conditions. Pflug Arch: Eur J Physiol 466:2177–2189
- Parnasa M, Petersa M, Dadona D, Leva S, Vertkinb I, Slutskyb I, Minkea B (2009) Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. Cell Calcium 45:300–309
- 56. Chen W, Xu B, Xiao A, Liu L, Fang X, Liu R, Turlova E, Barszczyk A, Zhong X, Sun CLF, Britto LRG, Feng ZP, Sun HS (2015) TRPM7 inhibitor carvacrol protects brain from neonatal hypoxic-ischemic injury. Molecular Brain 8:11
- 57. Szklarcyk D, Franchescini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguez P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P, Jensen LJ, Von Mering C (2011) The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. Nucl Acids Res 39:D561–D568
- Trouvé P, Kerbiriou M, Teng L, Benz N, Taiya M, Le Hir S, Férec C (2015) G551D-CFTR needs more bound actin than wildtype CFTR to maintain its presence in plasma membranes. Cell Biol Int. doi:10.1002/cbin.10456
- Trapani V, Schweigel-Röntgen M, Cittadini A, Wolf FI (2012) Chapter twenty-two: intracellular magnesium detection by fluorescent indicators. Methods Enzymol 505:421–444
- 60. Kim SJ, Kang HS, Jeong CW, Park SY, Kim IS, Kim NS, Kim SZ, Kwak YG, Kim JS, Quamme GA (2006) Immunosuppressants inhibit hormone-stimulated Mg²⁺ uptake in mouse distal convoluted tubule cells. Biochem Biophys Res Commun 341(3):742–748
- Schmitz C, Deason F, Perraud AL (2007) Molecular components of vertebrate Mg²⁺-homeostasis regulation. Magnes Res 20(1):6–18
- 62. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien Y (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 360:3440–3450
- Goytain A, Quamme GA (2005) Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter. Physiol Genomics 22:382–389
- Goytain A, Quamme GA (2005) Identification and characterization of a novel mammalian Mg²⁺ transporter with channel-like properties. BMC Genom 6:48
- 65. Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen RJ, Schweigel M (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. EMBO J 22:1235–1244
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J,

McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. Science 285:103–106

- 67. Wabakken T, Rian E, Kveine M, Aasheim HC (2003) The human solute carrier SLC41A1 belongs to a novel eukaryotic subfamily with homology to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters. Biochem Biophys Res Commun 306:718–724
- Sahni J, Nelson B, Scharenberg AM (2007) SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg²⁺ transporter. Biochem J 401:505–513
- 69. Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG (2004) TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. J Biol Chem 279:19–25
- Oancea E, Wolfe JT, Clapham DE (2006) Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. Circ Res 98(2):245–253
- Simon F, Varela D, Cabello-Verrugio C (2013) Oxidative stressmodulated TRPM ion channels in cell dysfunction and pathological conditions in humans. Cell Signal 25:1614–1624
- 72. Hermosura MC, Nayakanti H, Dorovkov MV, Calderon FR, Ryazanov AG, Haymer DS, Garruto RM (2005) TRPM7 variant shows altered sensitivity to magnesium that may contribute to the pathogenesis of two Guamanian neurodegenerative disorders. Proc Natl Acad Sci USA 102(32):11510–11515
- O'Rourke B (1993) Ion channels as sensors of cellular energy. Mechanisms for modulation by magnesium and nucleotides. Biochem Pharmacol 46(7):1103–1112
- 74. Hennager DJ, Ikuma M, Hoshi T, Welsh MJ (2001) A conditional probability analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gating indicates that ATP has multiple effects during the gating cycle. Proc Natl Acad Sci USA 98:3594–3599
- Hwang TC, Sheppard DN (1999) Molecular pharmacology of the CFTR Cl⁻ channel. Trend Pharmacol Sci 20:448–453
- Zeltwanger S, Wang F, Wang G-T, Gillis KD, Hwang TC (1999) Gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by adenosine triphosphate hydrolysis: quantitative analysis of a cyclic gating scheme. J Gen Physiol 113:541–554
- 77. Zhou SS, Takai A, Okada Y (2002) Regulation of cardiac CFTR Cl⁻ channel activity by a Mg²⁺-dependent protein phosphatase. Pflugers Arch: Eur J Physiol 444:327–334
- 78. Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, Esther CR Jr, Das J, Dokholyan NV, Randell SH, Boucher RC, Gentzsch M (2014) Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of ΔF508 CFTR in cystic fibrosis. Sci Transl Med 6(246):246ra96
- Park HS, Hong C, Kim BJ, So I (2014) The pathophysiologic roles of TRPM7 channel. Korean J Physiol Pharmacol 18(1):15–23
- Himmel B, Nagel G (2004) Protein kinase-independent activation of CFTR by phosphatidylinositol phosphates. EMBO Rep 5(1):85–90
- Kravtsov DV, Caputo C, Collaco A, Hoekstra N, Egan ME, Mooseker MS, Ameen NA (2012) Myosin Ia is required for CFTR brush border membrane trafficking and ion transport in the mouse small intestine. Traffic 13(8):1072–1082
- Vachel L, Norez C, Jayle C, Becq F, Vandebrouck C (2015) The low PLC-δ1 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells induces upregulation of TRPV6 channel activity. Cell Calcium 57(1):38–48
- Sun Y, Selvaraj S, Varma A, Derry S, Sahmoun AE, Singh BB (2013) Increase in serum Ca²⁺/Mg²⁺ ratio promotes proliferation of prostate cancer cells by activating TRPM7 channels. J Biol Chem 288:255–263
- 84. Ribeiro CM, Paradiso AM, Carew MA, Shears SB, Boucher RC (2005) Cystic fibrosis airway epithelial Ca²⁺ signaling: the mechanism for the larger agonist-mediated Ca²⁺ signals in

Deringer

human cystic fibrosis airway epithelia. J Biol Chem 280:10202–10209

- Zierler S, Yao G, Zhang Z, Kuo WC, Pörzgen P, Penner R, Horgen FD, Fleig A (2011) Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesiumdependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. J Biol Chem 286(45):39328–39335
- 86. Visser D, Langeslag M, Kedziora KM, Klarenbeek J, Kamermans A, Horgen FD, Fleig A, van Leeuwen FN, Jalink K (2013) TRPM7 triggers Ca²⁺ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells. Cell Calcium 54:404–415
- Oh HG, Chun YS, Park CS, Kim TW, Park MK, Chung S (2015) Regulation of basal autophagy by transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel. Biochem Biophys Res Commun 463(1–2):7–12
- Wei WL, Sun HS, Olah ME, Sun X, Czerwinska E, Czerwinski W et al (2007) TRPM7 channels in hippocampal neurons detect levels of extracellular divalent cations. Proc Natl Acad Sci USA 104:16323–16328
- Gupta A, Eastham KM, Wrightson N, Spencer DA (2007) Hypomagnesaemia in cystic fibrosis patients referred for lung transplant assessment. J Cyst Fibros 6:360–362
- Gontijo-Amaral C, Guimaraes EV, Camargos P (2012) Oral magnesium supplementation in children with cystic fibrosis improves clinical and functional variables: a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. Am J Clin Nutr 96:50–56
- Nel S, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JÁ, Lewenstam A (2000) Magnesium: an update on physiological, clinical and analytical aspects. Clin Chim Acta 294:1–26

2 Springer

DISCUSSION

I. Résultats et discussion

La sujet phare de ce projet de thèse est l'UPR, une réponse physiologique déclenchée par un stress du RE provoqué par l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière de ce compartiment [84]. Suite au stress du RE, le chef d'orchestre de l'UPR BiP déclenche cette réponse afin 1) d'arrêter la synthèse protéique de la cellule, 2) de réparer ou 3) de dégrader les protéines retenues dans le RE. Si l'homéostasie du RE n'est pas rétablie, l'UPR déclenche l'apoptose. Nous avons choisi d'étudier cette réponse dans un contexte de mucoviscidose [268]. Cette pathologie est due à une mutation du gène *cftr* conduisant à des défauts majeurs de la protéine CFTR. La mutation la plus fréquente, la F508del, est caractérisée par un défaut de repliement du CFTR-F508del qui est alors retenu par le système de contrôle qualité du RE et dégradé par le protéasome. Le CFTR-F508del n'est de ce fait que très peu exporté à la membrane et ne peut donc remplir correctement sa fonction de canal CI⁻ à la surface des cellules épithéliales [269].

Etant donné que le CFTR-F508del est retenu dans le RE, certains auteurs ont émis l'hypothèse que cette rétention serait susceptible de causer un stress du RE et de déclencher l'UPR. Diverses études ont ainsi été menées et plusieurs équipes ont montré que l'UPR est déclenchée dans des cellules exprimant un CFTR muté [242, 243, 270]. Pour le moment, ces études ont surtout montré que seulement quelques protéines de l'UPR telles que BiP, ATF6, XBP1 et CHOP sont surexprimées dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. Ainsi, seule la voie ATF6 semble activée dans ces cellules. Pour rappel, ATF6 est une protéine ancrée dans la membrane du RE en conditions normales. En conditions de stress du RE, BiP se dissocie d'ATF6 qui migre alors vers l'appareil de Golgi où elle est clivée successivement par S1P et S2P [135, 136]. La partie active d'ATF6 (ATF6-50 kDa) transite ensuite vers le noyau où elle agit en tant que facteur de transcription de gènes codant des protéines chaperons impliquées dans le repliement des protéines accumulées dans le RE et notamment le chaperon BiP. En parallèle, ATF6 induit l'expression de XBP1 impliqué notamment dans la dégradation des protéines du RE par le système ERAD [140]. Notre équipe a montré en 2007 que la voie ATF6 était déclenchée dans des cellules exprimant un CFTR-F508del [270]. Par ailleurs, selon une étude, ATF6 réprime transcriptionnellement le CFTR en se fixant sur le promoteur de ce dernier [245], faisant d'ATF6 une cible thérapeutique potentielle.

Dans ce projet, nous avons voulu étudier l'implication d'ATF6 dans la mucoviscidose. Une première partie du projet consistait à évaluer l'impact d'une inhibition d'ATF6 sur la fonction et l'exportation membranaire du CFTR. Afin de confirmer cette hypothèse, le premier objectif de ma thèse consistait donc à inhiber la voie ATF6 de l'UPR et évaluer l'impact de cette inhibition sur la fonction et l'exportation vers la membrane du CFTR-F508del dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques (CFBE). La première étape de cette étude était de valider notre modèle cellulaire en observant si l'UPR et notamment la voie ATF6 était déclenchée dans des CFBE-F508del en comparaison de CFBE-WT. L'augmentation dans les CFBE-F508del de l'expression de BiP, marqueur du stress du RE et de l'induction de l'UPR, nous a permis de confirmer que l'UPR était induite dans ces cellules. De plus, nous avons mesuré l'expression d'ATF6, que ce soit sa forme inactive (forme totale ATF6-90 kDa) ou active (forme clivée ATF6-50 kDa) afin de déterminer si plus particulièrement la voie ATF6 était active dans nos cellules F508del. Les données ont révélé une augmentation de la forme totale et clivée d'ATF6. Ces résultats sont en accord avec la littérature montrant que BiP et la voie ATF6 sont induites dans des cellules exprimant un CFTR-F508del [242, 243, 270].

Une fois notre modèle d'étude validé pour l'induction de l'UPR et de la voie ATF6, nous nous sommes intéressés à l'inhibition de cette voie. Afin d'inhiber le clivage et donc l'activation d'ATF6, nous avons choisi un inhibiteur des protéases à sérines dont S1P fait partie : l'AEBSF [271].

Nous avons donc testé l'effet de notre inhibiteur sur BiP, ATF6-90 kDa et ATF6-50 kDa. BiP étant en partie induite par la forme clivée d'ATF6, nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition du clivage d'ATF6 allait réduire l'expression du chaperon phare du RE. Les différentes cinétiques effectuées sur des cellules CFBE-F508del traitées à l'AEBSF nous ont permis d'observer que l'expression de BiP était significativement diminuée après quatre heures de traitement. De même pour ATF6-50 kDa dont l'expression diminue après une heure de traitement. Ces résultats valident le fait que l'utilisation de l'AEBSF dans notre modèle cellulaire permet bien une inhibition partielle de la voie ATF6 de l'UPR. Dans d'autres modèles cellulaires, plusieurs études ont obtenu des résultats similaires [245, 272, 273].

Nous avons ensuite voulu évaluer l'impact de l'inhibition de la voie ATF6 sur la fonction et l'exportation à la membrane du CFTR. Les données de *whole patch-clamp* indiquent que le traitement à l'AEBSF induit une augmentation significative des courants Cl⁻ dans des CFBE-F508del. Nous avons obtenu sensiblement les mêmes résultats en utilisant le PF-429242, un inhibiteur plus spécifique de S1P. Ces résultats pourraient s'expliquer par une augmentation de la présence du CFTR-F508del à la membrane. Afin de tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'expression du CFTR à la membrane de cellules *baby hamster kidney* (BHK)-F508del après inhibition de la voie ATF6. Les données de l'immunoprécipitation membranaire ont

permis de montrer qu'après inhibition d'ATF6 par l'AEBSF, l'expression membranaire du CFTR-F508del était augmentée, expliquant de fait l'augmentation de la fonction du CFTR observée en *whole patch-clamp*.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer que l'inhibition d'ATF6 induise l'exportation membranaire du CFTR-F508del. ATF6 réprime transcriptionnellement le CFTR et est en effet impliquée dans l'induction de protéines chargées du repliement et la dégradation des protéines mal repliées dans la lumière du RE. Ainsi, une diminution de l'expression des chaperonnes participant à la rétention du CFTR-F508del ou une diminution du système de dégradation ERAD ou du protéasome peuvent expliquer en partie le mécanisme par lequel l'inhibition d'ATF6 permet la libération du CFTR-F508del du RE se traduisant par une plus grande quantité de CFTR à la membrane. Afin de tenter d'éclaircir ce mécanisme, nous avons procédé à une électrophorèse 2D sur des CFBE-F508del non traitées et traitées à l'AEBSF. Le but de cette expérience étant de permettre l'isolation et l'identification des protéines dont l'expression varie à la suite d'un traitement à l'AEBSF.

Les résultats ont permis d'identifier six protéines. Deux d'entre elles sont des protéines nucléaires (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1* (HNRNRPH1) et *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3* (HNRH3)) et leur expression est diminuée dans les cellules traitées.

A l'inverse, l'expression des quatre autres protéines (GRP75, PDIA3, HSP7C et HSP71) est augmentée dans les cellules traitées.

Les deux protéines dont l'expression est diminuée suite au traitement à l'AEBSF sont des ribonucléoprotéines capables de se lier aux ARN et participant notamment à la prise en charge des pré-ARNm et ARNm dans les processus de maturation-épissage et de transport de ces derniers. De par leur fonction, ces protéines sont retrouvées dans le noyau et dans le cytoplasme [274]. Une étude a montré que l'expression de HNRNRPH1 et HNRH3 était augmentée en même temps que l'expression de BiP [275]. Le fait que l'expression de BiP soit diminuée à la suite de l'inhibition d'ATF6 pourrait expliquer que l'expression de ces protéines soit également diminuée. De par leurs multiples implications dans les processus liés aux pré-ARNm et ARNm dans le fonctionnement général de la cellule, l'hypothèse d'une absence de lien avec ATF6 ou le CFTR est également possible.

Les quatre protéines dont l'expression est retrouvée augmentée à la suite du traitement à l'AEBSF sont des protéines chaperons.

GRP75 est une protéine localisée principalement dans la mitochondrie mais elle est également retrouvée dans le cytosol et le RE. Cette protéine est impliquée dans plusieurs fonctions

cellulaires telles que la réponse au stress, la prolifération et la différenciation cellulaire [276]. GRP75 a été retrouvée surexprimée dans une étude cherchant à identifier les protéines modulées à la suite d'un traitement au 4-PBA, un correcteur du CFTR-F508del [277], ce qui peut expliquer que nous la retrouvions également dans nos cellules traitées. De plus, une autre étude a également montré GRP75 est associée à la forme immature B du CFTR dans le RE [278]. HSP71, localisée dans le cytosol, est une protéine chaperon impliquée dans plusieurs processus liés à la biogénèse protéique tels que le repliement, l'agrégation et la dégradation des protéines. Elle est également inductible par le stress [279]. Le fait que nous retrouvions cette protéine est impliquée dans le transport du CFTR-WT vers le Golgi et dans la dégradation du CFTR-F508del [280].

HSP7C est retrouvée principalement dans le cytoplasme mais également dans le noyau et à la membrane des cellules. Cette protéine est notamment impliquée dans le repliement et le transport des protéines néo-synthétisées ainsi que dans la dégradation des protéines mal repliées [221].

HSC7C est retrouvée dans les protéines faisant partie du premier point de contrôle du CFTR. Curieusement, cette protéine est surexprimée dans nos cellules traitées alors que plusieurs études ont montré que son inhibition était associée à une exportation du CFTR-F508del vers la membrane [235, 281]. D'autres paramètres sont probablement à prendre en compte et une étude approfondie permettrait d'éclaircir l'implication de cette protéine dans notre modèle.

Enfin, PDIA3 est une protéine résidente du RE et impliquée dans le repliement des protéines de par sa fonction d'isomérase [282]. De manière intéressante, la PDIA3 est surexprimée lors d'une exportation du CFTR-F508del vers la membrane à la suite d'un traitement chimique au 4-PBA [278] et à la trichostatine A [241]. Il n'est donc pas étonnant que nous la retrouvions surexprimée également dans nos cellules traitées.

Nous avons par la suite essayé de trouver de possibles interactions entre ces protéines à l'aide de la base de données STRING et nous avons trouvé que toutes ces protéines ont une interaction commune avec l'ubiquitine C (UBC). Cette dernière intervient dans les processus d'ubiquitinylation liés à la dégradation des protéines. De plus, le gène codant l'UBC est induit lors d'un stress [283] et également dans les cellules exprimant un CFTR-F508del [241]. Nous ne savons pas si l'expression de l'UBC est modulée dans nos cellules traitées, mais au vu du rôle central de l'UBC dans la régulation des gènes modificateurs du CFTR [284], il semblerait que de plus amples investigations soient nécessaires.

La seconde partie de mon projet de thèse portait sur l'étude de la $[Mg^{2^+}]_i$ et de TRPM7 dans la mucoviscidose. Plusieurs travaux ont montré l'impact d'une modification de la $[Mg^{2^+}]_i$ sur la transcription, la traduction et la fonction du CFTR [230-232]. Ainsi, des variations de la $[Mg^{2^+}]_i$ pourraient accentuer les effets déjà délétères de la mutation sur le CFTR. Le but de l'étude était donc dans un premier temps de mesurer la $[Mg^{2^+}]_i$ dans un contexte de mucoviscidose.

Pour cela, nous avons travaillé sur des cellules HeLa transfectées de manière stable avec un plasmide codant un CFTR-WT ou F508del. Afin de déterminer plus finement les causes d'une éventuelle différence de $[Mg^{2+}]_i$ selon le CFTR, nous avons également utilisé des cellules exprimant un CFTR-G551D et des cellules non-transfectées (NT). Nous avions donc à notre disposition des cellules n'exprimant pas de CFTR (NT), des cellules exprimant un CFTR à la membrane et fonctionnel (WT), des cellules exprimant un CFTR à la membrane mais non fonctionnel (G551D) et enfin des cellules exprimant un CFTR retenu dans le RE (F508del).

La première étape consistait à mesurer, et ce, pour la première fois, la $[Mg^{2+}]_i$ dans des cellules NT, WT, F508del et G551D. Les mesures ont révélé que la $[Mg^{2+}]_i$ était significativement plus basse dans les HeLa-NT, F508del et G551D en comparaison des HeLa-WT. De plus, la $[Mg^{2+}]_i$ est significativement plus basse dans le HeLa-G551D en comparaison des HeLa-F508del.

Nous avons émis l'hypothèse que ces différences de $[Mg^{2^+}]_i$ observées avaient comme origine une potentielle altération de l'expression, de la localisation et/ou de la fonction du TRPM7 dans ces cellules, ce dernier étant un canal permettant l'entrée de Mg^{2^+} dans la cellule et étant le régulateur principal de la $[Mg^{2^+}]_i$ [285].

Nous avons tout d'abord mesuré l'expression de l'ARNm de TRPM7 par PCR quantitative et n'avons observé aucune différence significative entre nos quatre lignées. Nous avons donc mesuré l'expression de TRPM7 dans des lysats totaux de nos cellules et avons observé que cette expression n'était pas homogène entre nos différents mutants. En effet, les HeLa-WT expriment significativement moins de TRPM7 que les HeLa-NT, F508del et G551D.

Concernant la localisation à la membrane de TRPM7 dans nos mutants, nous avons opté pour une technique de biotinylation qui n'a été réalisée qu'une seule fois et n'a donc pas pu révéler de différences significatives. Bien que cela n'ait pas été quantifié, l'observation de TRPM7 par immuno-fluorescence (IF) tend à montrer que TRPM7 serait localisé à la membrane dans nos HeLa-WT et F508del bien que le signal soit moins fort dans ces dernières. En revanche, les images d'IF n'indiquent pas la présence de TRPM7 à la membrane de HeLa-NT et G551D. En l'absence de résultats statistiques probants, bien que ces résultats soient en accord avec la littérature [286], les observations réalisées quant à la localisation à la membrane de TRPM7 restent difficilement interprétables.

Etant donné que l'expression de TRPM7 est plus forte dans les HeLa-NT, F508del et G551D mais que la $[Mg^{2^+}]_i$ est plus basse comparée aux HeLa-WT, nous avons mis en avant l'hypothèse d'une dysfonction de TRPM7 dans les HeLa-NT, F508del et G551D. Afin de vérifier que notre protocole de *whole patch-clamp* permette bien de mesurer l'activité de TRPM7, nous avons ajouté du Mg²⁺ dans le milieu intracellulaire durant la mesure. TRPM7 est en effet inhibé par le Mg²⁺ intracellulaire et nous avons pu observer cette diminution d'activité de TRPM7, validant ainsi notre protocole de *whole patch-clamp*. C'est sans surprise que les résultats de *whole patch-clamp* nous ont confirmé que l'activité de TRPM7 était diminuée dans les HeLa-F508del et G551D. En revanche, le TRPM7 des HeLa-NT présente une fonction identique à celle des HeLa-WT. Pour les HeLa-WT, F508del et G551D, ces résultats concordent avec la $[Mg^{2^+}]_i$ mesurée en premier lieu. De manière assez logique, la diminution de $[Mg^{2^+}]_i$ observée dans les cellules serait en partie due à une diminution de l'activité de TRPM7.

Enfin, nous avons voulu évaluer l'impact d'une modulation de l'activité de TRPM7 sur l'activité du CFTR. Pour cela, nous avons activé (par du Naltriben) et inhibé (par du Carvacrol) TRPM7 et mesuré l'activité du CFTR. Nous avons tout d'abord mesuré l'activité de TRPM7 en présence de Natrilben ou de Carvacrol afin de nous assurer de l'efficacité de ces derniers, ce qui a été le cas. Concernant les résultats, l'inhibition de TRPM7 ne nous a pas permis d'observer d'effets significatifs sur la fonction de CFTR. Cependant, l'interprétation de ces résultats est à modérer car le Carvacrol inhibe TRPM7 de manière non spécifique en libérant les réserves de $Ca^{2+}du$ RE vers le cytosol. En effet, une $[Ca^{2+}]_i$ élevée inhibe TRPM7 [287]. Le Ca^{2+} étant impliqué en tant que second messager dans de multiples voies de signalisation, l'utilisation du Carvacrol peut conduire à l'apparition de biais dans l'expérimentation. L'activation de TRPM7 par le Naltriben a en revanche montré des résultats significatifs. Dans les HeLa-WT et F508del l'activation de TRPM7 entraîne l'inhibition des courants Cl⁻ liés au CFTR. Dans les HeLa-G551D, le Naltriben a conduit à une augmentation de plus de 800 % des courants Cl⁻ liés au CFTR. Les résultats concernant le CFTR-WT et F508del peuvent s'expliquer par le fait que l'augmentation de l'activité de TRPM7 conduit à une [Mg²⁺]_i trop élevée pour le fonctionnement du CFTR. Une étude a en effet montré qu'une [Mg²⁺]_i trop élevée diminue l'activité du CFTR [288]. De manière surprenante, les résultats obtenus sur les HeLa-G551D à la suite de l'activation de TRPM7 sont opposés à ceux obtenus sur les HeLa-WT et F508del. Une hypothèse serait qu'étant donné que TRPM7 est absent de la membrane dans les HeLaG551D, l'activation de TRPM7 ne serait pas suffisante pour atteindre une $[Mg^{2+}]_i$ assez élevée pour avoir un effet inhibiteur sur le CFTR.

II. Conclusion - Perspectives

En conclusion, les résultats du premier projet de cette thèse confirment qu'ATF6 est bien impliquée dans la répression du CFTR. L'inhibition de cette voie de l'UPR permet en effet une augmentation de la présence du CFTR-F508del à la membrane des cellules traitées.

Une des suites de ce projet pourrait consister à confirmer ces résultats en utilisant un inhibiteur plus spécifique d'ATF6 tel que les *ceapins* développées dans le laboratoire de Peter Walter [185]. L'AEBSF est en effet une molécule agissant sur les protéases à sérines impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires. Ainsi, l'hypothèse que d'autres voies de signalisation ou protéines modulées par l'AEBSF aient un effet sur le CFTR-F508del n'est pas à exclure. Seule une inhibition plus spécifique permettra de confirmer le rôle d'ATF6. Si les *ceapins* s'avèrent efficaces dans notre modèle cellulaire, il serait intéressant de les associer avec un potentiateur tel que l'Ivacaftor et/ou un stabilisateur afin d'observer les effets de l'association de ces trois molécules sur le CFTR-F508del.

A l'inverse, dans le cas où ces molécules ne permettraient pas d'exporter le CFTR-F508del vers la membrane, une des hypothèses envisagées serait que l'AEBSF module l'expression d'une ou plusieurs protéines impliquées dans la rétention ou l'exportation du CFTR. Il s'agirait de s'intéresser dans un premier temps aux protéines identifiées en 2D, mais également à l'UBC qui semble être une piste thérapeutique intéressante.

Une autre perspective envisageable consisterait à tester l'inhibition de la voie ATF6 et observer l'impact sur le CFTR dans des cultures primaires (cellules nasales ou bronches humaines). Etant donné la pertinence du modèle, cela permettrait la validation des données obtenues dans ce projet. Bien que l'idée paraisse séduisante, l'étude de l'UPR dans des cultures primaires de patients atteints de mucoviscidose est difficile de par les biais techniques qu'elle impose. En guise d'exemple, les patients sont régulièrement traités par une multitude de médicaments pouvant influer sur l'UPR. De plus, les tissus des voies aériennes de ces patients présentent régulièrement des épisodes inflammatoires, un autre inducteur de l'UPR. Comme beaucoup d'études sur les cultures primaires, les différences génétiques existant entre différents patients peuvent grandement influer sur les résultats finaux. Un moyen de contourner ce biais serait d'obtenir un grand nombre d'échantillons, ce dont le laboratoire ne dispose pas en ce moment. Par ailleurs, ces différences génétiques peuvent rendre très complexe l'interprétation des résultats dans un modèle que nous ne maîtrisons que très peu pour le moment.

De plus, un projet intéressant serait d'étudier l'impact d'une modulation de l'UPR sur l'inflammation très présente dans la mucoviscidose et participant à la destruction progressive des tissus chez les patients. La relation entre l'UPR et l'inflammation est bilatérale : d'un côté l'inflammation peut déclencher l'UPR et d'une autre côté l'UPR peut déclencher l'inflammation via la voie NF-kB [289]. Il serait intéressant dans un premier temps de caractériser cette inflammation dans un modèle cellulaire le permettant. Dans un second temps, il s'agirait d'observer si la modulation spécifique des différentes voies de l'UPR permettrait une diminution significative de l'inflammation.

En conclusion de la seconde partie, nous avons montré qu'il existe des différences de la $[Mg^{2+}]_i$ entre des lignées exprimant un CFTR sauvage ou muté. De plus, cette étude a confirmé le lien étroit déjà observé entre le CFTR et le Mg^{2+} [230-232]. Notre étude révèle également que ces différences de $[Mg^{2+}]_i$ seraient en partie dues à un défaut d'activité du TRPM7. Quant à ce défaut d'activité, il est fort probable qu'il soit lié à la fonction du CFTR muté. Dans les cellules où la fonction du CFTR est altérée nous avons en effet observé une diminution de l'activité de TRPM7, suggérant qu'il existe un lien entre le CFTR et TRPM7.

De la même manière que le CFTR régule l'activité de ENaC, il est possible que le CFTR régule l'activité de TRPM7. Des expériences de mutagénèse dirigée sur un plasmide codant TRPM7 pourraient permettre de préciser le ou les différents domaines de TRPM7 impliqués dans cette éventuelle interaction. En effet, ces différents plasmides mutés de TRPM7 pourraient être introduits dans nos cellules afin d'observer si l'activation des mutants de TRPM7 permet d'obtenir des résultats similaires. En parallèle, après avoir produit et purifié TRPM7 et le CFTR, des expériences telles que la résonance plasmonique de surface (RPS) ou l'Overlay pourraient aider dans la détermination d'une éventuelle interaction directe entre ces deux canaux ioniques. Afin de valider les résultats obtenus dans cette étude, il serait également nécessaire de réaliser une série d'expériences similaires mais dans un modèle cellulaire comme les CFBE qui s'avère plus pertinent du point de vue du CFTR. Ces cellules sont en effet issues d'un patient homozygote pour la mutation F508del. Elles ont par la suite été transfectées avec un CFTR-F508del recombinant (CFBE-F508del) ou corrigées par transfection d'un CFTR-WT (CFBE-WT).

Il s'agirait également de refaire les expériences d'inhibition de TRPM7 et d'observer l'activité du CFTR mais cette fois-ci en utilisant un inhibiteur plus spécifique tel que la Waixenicine A [290, 291].

Pour finir, nos résultats montrent que l'activation de TRPM7 par le Naltriben dans des cellules exprimant un CFTR-G551D permet de potentialiser l'activité de ce dernier. Cependant, notre étude ne permet pas de savoir si l'augmentation des courants Cl⁻ par le Naltriben est due à

l'activation de TRPM7 ou à un éventuel effet du Naltriben sur le CFTR. Il serait donc intéressant d'éclaircir ce point en mutant par exemple le TRPM7 de manière à ce qu'il ne s'ouvre plus et observer si le Naltriben a toujours le même effet sur l'activité du CFTR. Quoiqu'il en soit, l'utilisation de molécules telles que le Naltriben ouvrent de nouvelles perspectives de piste thérapeutique dans la mucoviscidose. De plus de par ses nombreuses fonctions et son implication dans diverses pathologies, de plus en plus de laboratoire de recherche considèrent ce canal comme une cible thérapeutique majeure. La recherche de modulateur spécifique par screening (chimiothèques) représente un enjeu majeur dans le traitement de plusieurs maladies dans lesquelles TRPM7 est surexprimé et/ou suractivé [292]. Il serait donc intéressant de d'évaluer les effets de la Waixenicine A sur des modèles cellulaires de fibrose.

Concernant la suite de cette étude, il me paraît important de se focaliser sur la relation potentielle entre la $[Mg^{2+}]_i$ et ATF6 par l'intermédiaire de TRPM7. Ce qu'il serait intéressant de faire dans un premier temps, c'est de mesurer l'expression d'ATF6-90 kDa et ATF6-50 kDa dans les mêmes lignées que nous avons utilisées et des CFBE et voir si ces résultats sont corrélés avec l'expression et/ou la fonction de TRPM7. Dans un second temps, il serait intéressant de moduler l'expression et/ou l'activité de TRPM7 afin d'observer de possibles variations des formes d'ATF6 et notamment la forme clivée. Dans le cas où ATF6 serait réellement activée par l'inhibition de TRPM7, l'activation de ce dernier permettrait, via l'inhibition d'ATF6, d'augmenter l'exportation membranaire du CFTR. Si ces expériences se révèlent concluantes, des expériences de 2D couplées à la spectrométrie de masse pourraient aider dans la détermination d'une voie de signalisation éventuelle entre TRPM7 et ATF6.

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Kendrew, J., *Structure and Function in Myoglobin and Other Proteins*. Federation Proceedings, 1959. **18(1)**: p. 740-751.
- 2. Afinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973. **181**(July): p. 223-230.
- 3. Petsko, G.A. and D. Ringe, *Structure et fonction des protéines*, ed. D. Boek. 2008, Bruxelles.
- 4. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, *The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(6): p. 716-31.
- 5. Hoozemans, J.J., J. Stieler, E.S. van Haastert, R. Veerhuis, A.J. Rozemuller, F. Baas, P. Eikelenboom, T. Arendt, and W. Scheper, *The unfolded protein response affects neuronal cell cycle protein expression: implications for Alzheimer's disease pathogenesis.* Exp Gerontol, 2006. **41**(4): p. 380-6.
- 6. Hoozemans, J.J., E.S. van Haastert, D.A. Nijholt, A.J. Rozemuller, P. Eikelenboom, and W. Scheper, *The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1241-51.
- 7. Hoozemans, J.J., R. Veerhuis, E.S. Van Haastert, J.M. Rozemuller, F. Baas, P. Eikelenboom, and W. Scheper, *The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2005. **110**(2): p. 165-72.
- 8. Sammels, E., J.B. Parys, L. Missiaen, H. De Smedt, and G. Bultynck, *Intracellular Ca2+ storage in health and disease: a dynamic equilibrium*. Cell Calcium, 2010. **47**(4): p. 297-314.
- 9. Recasens, A., B. Dehay, J. Bove, I. Carballo-Carbajal, S. Dovero, A. Perez-Villalba, P.O. Fernagut, J. Blesa, A. Parent, C. Perier, I. Farinas, J.A. Obeso, E. Bezard, and M. Vila, *Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys.* Ann Neurol, 2014. **75**(3): p. 351-62.
- 10. Peachey, L.D., *Keith R. Porter*. Biographical Memoirs, 2013.
- 11. Porter, K., A. Claude, and E. Fullam *A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY*. J Exp Med, 1945. **81(3)**: p. 233-46.
- 12. Porter, K. and H.P. Thompson, *Some morphological Features of cultured rat sarcoma. Cells as revealed by the Electron Microscope.* Cancer Research, 1947. 7(July): p. 431-438.
- 13. Porter, K. and H.P. Thompson, *A particulate body associated with epithelial cells cultured from mammary carcinomas of mice of milk-factor strain.* Journal of Experimental Medicine, 1948. **88**(March): p. 15-24.
- 14. Porter, K. and F.L. Kallman, *Significance of cell particulates as seen by electron microscopy*. Ann. New York Acad. Sc., 1952. **54**(July).
- 15. Porter, K., *Observations on a submicroscopic basophilic component of cytoplasm*. Exp. Med., 1953. **97**(December): p. 727-750.
- 16. Shibata, Y., G.K. Voeltz, and T.A. Rapoport, *Rough sheets and smooth tubules*. Cell, 2006. **126**(3): p. 435-9.
- 17. Baumann, O. and B. Walz, *Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains*. Int Rev Cytol, 2001. **205**: p. 149-214.
- 18. Caro, L.G. and G.E. Palade, *Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell.* the journal of cell biology, 1964. **20**(March): p. 473-495.
- Palade, G.E., Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. Science, 1975.
 189(August): p. 347-358.
- 20. Kaufman, R.J., *Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum : coordination of gene transcription and translational controls.* Genes and development, 1999. **13**: p. 1211-1233.

- 21. Imaizumi, K., K. Miyoshi, T. Katayama, T. Yoneda, M. Taniguchi, T. Kudo, and M. Tohyama, *the unfolded protein response and Alzheimer's disease*. biochim Biophys Acta, 2001. **1536**: p. 85-96.
- 22. Cooper, G., *The Cell. A Molecular Approach. 2nd Edition*, Sunderland, Editor. 2000, Sinauer Associates ASM.
- 23. Lodish, H., A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, *Molecular Cell Biology, 4th edition.* 2000, New York: W. H. Freeman. 1184.
- 24. High, S., S.S.L. Andersen, D. Gorlich, E. Hartmann, S. Prehn, T.A. Rapoport, and B. Dobberstein, *Sec61p is adjacent to nascent type I and Type II Signal-Acnhor protein during their membrane integration.* the journal of cell biology, 1993. **121**(May): p. 743-750.
- 25. Mothes, W., S.U. Heinrich, R. Graf, I. Nilsson, G. von Heije, J. Brunner, and T.A. Rapoport, *Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum*. Cell, 1997. **89**(May): p. 523-533.
- 26. Dobson, C.M., *Principles of protein folding, misfolding and aggregation*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 3-16.
- 27. Ellis, R.J. and A.P. Minton, *Join the crowd*. Nature, 2003. **425**(September): p. 27-28.
- 28. Gething, M.-J. and J. Sambrook, *Protein folding in the cell*. Nature, 1992. **355**(January): p. 33-45.
- 29. Karplus, M., *The Levinthal paradox : yesterday and today*. Folding and Design, 1997.
 2 Supplement: p. 69-75.
- 30. Naganathan, A.N. and V. Munoz, *Scaling of folding times with protein size*. J. AM. CHEM. SOC., 2005. **127**: p. 480-481.
- 31. Laskey, R.A., B.M. Honda, A.D. Mills, and J.T. Finch, *Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA*. Nature Cell Biology, 1978. **275**(October): p. 416-420.
- 32. Morange, M., Protéines chaperons. médecine/sciences, 2000. 16(Mai): p. 630-4.
- 33. Tartaglia, G.G., A. Cavalli, and M. Vendruscolo, *Prediction of local structural stabilities of proteins from their amino acid sequences*. Structure, 2007. **15**(2): p. 139-143.
- 34. Mogk, A., C. Schlieker, K.L. Friedrich, H.J. Schonfeld, E. Vierling, and B. Bukau, *Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31033-42.
- 35. Mogk, A., E. Deuerling, S. Vorderwülbecke, E. Vierling, and B. Bukau, *Small heat shock proteins, ClpB ans the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation.* Molecular Microbiology, 2003. **50**: p. 585-595.
- 36. Schlieker, C., B. Bukau, and A. Mogk, *Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in E. coli: implications for their applicability in biotechnology*. Journal of Biotechnology, 2002. **96**: p. 13-21.
- 37. Liberek, K., A. Lewandowska, and S. Zietkiewicz, *Chaperones in control of protein disaggregation*. The EMBO Journal, 2008. **27**(2): p. 328-335.
- Schlesinger, M.J., *Heat Shock Proteins*. The Journal of Biological Chemistry, 1990.
 265(July): p. 12111-12114.
- Hendershot, L.M., J. Wei, J. Gaut, J. Melnick, S. Aviel, and Y. Argon, *Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(May): p. 5269-5274.
- 40. Ellis, R.J., *Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding.* Trends Biochem Sci, 2006. **31**(7): p. 395-401.
- 41. Ellgaard, L. and A. Helenius, *ER quality control: towards an understanding at the molecular level.* Current Opinion in Cell Biology, 2001. **13**: p. 431-437.

- 42. McCaffrey, K. and I. Braakman, *Protein quality control at the endoplasmic reticulum*. Essays Biochem, 2016. **60**(2): p. 227-235.
- 43. Kleizen, B. and I. Braakman, *Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 343-9.
- 44. Sevier, C.S. and C.A. Kaiser, *Formation and transfer of disulphide bonds in living cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(11): p. 836-47.
- 45. Corfield, A., *Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists.* Histochem Cell Biol, 2017. **147**(2): p. 119-147.
- 46. Ferris, S.P., V.K. Kodali, and R.J. Kaufman, *Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases*. Dis Model Mech, 2014. 7(3): p. 331-41.
- 47. Molinari, M., C. Galli, V. Piccaluga, M. Pieren, and P. Paganetti, *Sequential assistance* of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. J Cell Biol, 2002. **158**(2): p. 247-57.
- 48. Hosokawa, N., L.O. Tremblay, Z. You, A. Herscovics, I. Wada, and K. Nagata, *Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I.* J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 26287-94.
- Ninagawa, S., T. Okada, Y. Sumitomo, Y. Kamiya, K. Kato, S. Horimoto, T. Ishikawa, S. Takeda, T. Sakuma, T. Yamamoto, and K. Mori, *EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step.* J Cell Biol, 2014. 206(3): p. 347-56.
- 50. Roth, J. and C. Zuber, *Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9.* Histochem Cell Biol, 2017. **147**(2): p. 269-284.
- 51. Hosokawa, N., L.O. Tremblay, B. Sleno, Y. Kamiya, I. Wada, K. Nagata, K. Kato, and A. Herscovics, *EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans*. Glycobiology, 2010. **20**(5): p. 567-75.
- 52. Hirao, K., Y. Natsuka, T. Tamura, I. Wada, D. Morito, S. Natsuka, P. Romero, B. Sleno, L.O. Tremblay, A. Herscovics, K. Nagata, and N. Hosokawa, *EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming.* J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9650-8.
- 53. Hosokawa, N., Y. Kamiya, and K. Kato, *The role of MRH domain-containing lectins in ERAD*. Glycobiology, 2010. **20**(6): p. 651-60.
- 54. Hosokawa, N., Y. Kamiya, D. Kamiya, K. Kato, and K. Nagata, *Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans.* J Biol Chem, 2009. **284**(25): p. 17061-8.
- 55. Mueller, B., B.N. Lilley, and H.L. Ploegh, *SEL1L, the homologue of yeast Hrd3p, is involved in protein dislocation from the mammalian ER.* J Cell Biol, 2006. **175**(2): p. 261-70.
- 56. Ninagawa, S., T. Okada, S. Takeda, and K. Mori, *SEL1L is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal proteins but not transmembrane proteins in chicken DT40 cell line.* cell structure and function, 2011. **36**: p. 187-195.
- 57. Christianson, J.C., T.A. Shaler, R.E. Tyler, and R.R. Kopito, *OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 272-82.
- 58. Gillece, P., J.M. Luz, W.J. Lennarz, J. Javier de la Cruz, and K. Römish, *Export of a cyteine-free misfolded secretoryprotein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase*. the journal of cell biology, 1999. **147**(December): p. 1443-1456.

- 59. Yang, H., X. Zhong, P. Ballar, S. Luo, Y. Shen, D.C. Rubinsztein, M.J. Monteiro, and S. Fang, *Ubiquitin ligase Hrd1 enhances the degradation and suppresses the toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin*. Exp Cell Res, 2007. **313**(3): p. 538-50.
- 60. Hosokawa, N. and I. Wada, *Association of the SEL1L protein transmembrane domain with HRD1 ubiquitin ligase regulates ERAD-L*. FEBS J, 2016. **283**(1): p. 157-72.
- 61. Xu, C. and D.T. Ng, *Glycosylation-directed quality control of protein folding*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(12): p. 742-52.
- 62. Fang, S., M. Ferrones, C. Yang, J.P. Jensen, S. Tiwari, and A.M. Weissman, *The tumor* autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. PNAS, 2001. **98**(December): p. 14422-14427.
- 63. Skowronek, M.H., L.M. Hendershot, and I.G. Haas, *The variable domain of nonassembled Ig light chains determines both their half-life and binding to the chaperone BiP.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **95**(February): p. 1574-1578.
- 64. Ushioda, R., J. Hoseki, and K. Nagata, *Glycosylation-independent ERAD pathway* serves as a backup system under ER stress. Mol Biol Cell, 2013. **24**(20): p. 3155-63.
- 65. Ninagawa, S., T. Okada, Y. Sumitomo, S. Horimoto, T. Sugimoto, T. Ishikawa, S. Takeda, T. Yamamoto, T. Suzuki, Y. Kamiya, K. Kato, and K. Mori, *Forcible destruction of severely misfolded mammalian glycoproteins by the non-glycoprotein ERAD pathway.* J Cell Biol, 2015. **211**(4): p. 775-84.
- 66. Ushioda, R. and K. Nagata, *The endoplasmic reticulum-associated degradation and disulfide reductase ERdj5*. Methods Enzymol, 2011. **490**: p. 235-58.
- 67. Shenkman, M., B. Groisman, E. Ron, E. Avezov, L.M. Hendershot, and G.Z. Lederkremer, *A shared endoplasmic reticulum-associated degradation pathway involving the EDEM1 protein for glycosylated and nonglycosylated proteins*. J Biol Chem, 2013. **288**(4): p. 2167-78.
- 68. Romisch, K., *A Case for Sec61 Channel Involvement in ERAD*. Trends Biochem Sci, 2017. **42**(3): p. 171-179.
- 69. Mori, K., *The unfolded protein response: the dawn of a new field*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2015. **91**(9): p. 469-80.
- 70. Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M.-J. Gething, and J. Sambrook, *The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-related protein*. Nature, 1988. **332**(March): p. 462-464.
- 71. Stone, K.R., R.E. Smith, and W.K. Joklik, *Changes in membrane polypeptides that occur when chick embryo fibroblats and NRK cells are transformed with avian sarcoma viruses*. Virology, 1974. **58**: p. 86-100.
- 72. Isaka, T. and M. Yoshida, *Alterations in membrane polypeptides of chick embryo fibroblasts induced by transformation with avian sarcoma viruses.* Virology, 1975. **65**: p. 226-237.
- 73. Shiu, R.P.C., J. Pouyssegur, and I. Pastan, *Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblats.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(September): p. 3840-3844.
- 74. Munro, S. and R.B. Pelham, *An Hsp70-like protein in the ER: identify with the 78 kd glucose-related protein and immunoglobulin heavy chain binding protein.* Cell, 1986. **46**(July): p. 291-300.
- 75. Haas, I.G. and M. Wabl, *Immunoglobulin heavy chain binding protein*. Nature, 1983. **306**(November): p. 387-389.
- 76. Lee, A.S., *Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells.* Trends Biochem Sci, 1987. **12**(January): p. 20-23.

- 77. Normington, K., K. Kohno, Y. Kozutsumi, M.-J. Gething, and J. Sambrook, S. cerevisiae encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. Cell, 1989. **57**(June): p. 1223-1236.
- 78. Lai, E., T. Teodoro, and A. Volchuk, *Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response*. Physiology (Bethesda), 2007. **22**: p. 193-201.
- 79. Schroder, M. and R.J. Kaufman, *ER stress and the unfolded protein response*. Mutat Res, 2005. **569**(1-2): p. 29-63.
- 80. Chong, W.C., M.D. Shastri, and R. Eri, *Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(4).
- 81. Lee, A.S., *The glucose-related proteins: stress induction and clinical applications*. Trends Biochem Sci, 2001. **25**(August): p. 504-510.
- 82. Hetz, C., E. Chevet, and S.A. Oakes, *Proteostasis control by the unfolded protein response*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(7): p. 829-38.
- 83. Fabienne Foufelle and P. Ferré, *La réponse UPR Son rôle physiologique et physiopathologique*. medecine/sciences, 2007. **23**: p. 291-296.
- 84. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*. Science, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
- 85. Yates, A., W. Akanni, M.R. Amode, D. Barrell, K. Billis, D. Carvalho-Silva, C. Cummins, P. Clapham, S. Fitzgerald, L. Gil, C.G. Giron, L. Gordon, T. Hourlier, S.E. Hunt, S.H. Janacek, N. Johnson, T. Juettemann, S. Keenan, I. Lavidas, F.J. Martin, T. Maurel, W. McLaren, D.N. Murphy, R. Nag, M. Nuhn, A. Parker, M. Patricio, M. Pignatelli, M. Rahtz, H.S. Riat, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, A. Vullo, S.P. Wilder, A. Zadissa, E. Birney, J. Harrow, M. Muffato, E. Perry, M. Ruffier, G. Spudich, S.J. Trevanion, F. Cunningham, B.L. Aken, D.R. Zerbino, and P. Flicek, *Ensembl 2016*. Nucleic Acids Res, 2016. 44(D1): p. D710-6.
- 86. Wang, J., J. Lee, D. Liem, and P. Ping, *HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum.* Gene, 2017.
- 87. Wisniewska, M., T. Karlberg, L. Lehtio, I. Johansson, T. Kotenyova, M. Moche, and H. Schuler, *Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78.* PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8625.
- 88. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism.* Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(6): p. 670-84.
- Yang, J., M. Nune, Y. Zong, L. Zhou, and Q. Liu, *Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP.* Structure, 2015. 23(12): p. 2191-203.
- 90. Jin, Y., W. Awad, K. Petrova, and L.M. Hendershot, *Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins bu BiP*. The EMBO Journal, 2008. **27**: p. 2873-2882.
- 91. Lai, C.W., J.H. Otero, L.M. Hendershot, and E. Snapp, *ERdj4 protein is a soluble endoplasmic reticulum (ER) DnaJ family protein that interacts with ER-associated degradation machinery*. J Biol Chem, 2012. **287**(11): p. 7969-78.
- 92. Shen, Y. and L.M. Hendershot, *ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DNAJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates.* Molecular Biology of the Cell, 2005. **16**(January): p. 40-50.
- 93. Shen, Y., L. Meunier, and L.M. Hendershot, *Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress.* J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15947-56.

- 94. Tyson, J.R. and C. Stirling, *LHS1 and SIL1 provide a lumenal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum.* The EMBO Journal, 2000. **19**: p. 6440-6452.
- 95. Chung, K.T., Y. Shen, and L.M. Hendershot, *BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP.* J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47557-63.
- Yan, M., J. Li, and B. Sha, Structural analysis of the Sill-Bip complex reveals the mechanism for Sill to function as a nucleotide-exchange factor. Biochem J, 2011. 438(3): p. 447-55.
- 97. Behnke, J., M.J. Feige, and L.M. Hendershot, *BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions.* J Mol Biol, 2015. **427**(7): p. 1589-608.
- 98. NGuyen, T.H., D.T.S. Law, and D.B. Williams, *Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(February): p. 1565-1569.
- 99. Awe, K., C. Lambert, and R. Prange, *Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein.* FEBS Lett, 2008. **582**(21-22): p. 3179-84.
- 100. Simon, S.M., C.S. Peskin, and G.F. Oster, *What drives the translocation of proteins*? Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(May): p. 3770-3774.
- 101. Glick, B.S., Can Hsp70 proteins act as force-generating motors ? Cell, 1995. **70**(January): p. 11-14.
- 102. Hamman, B.D., L.M. Hendershot, and A.E. Johnson, *BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation.* Cell, 1998. **92**(March): p. 747-758.
- 103. Schauble, N., S. Lang, M. Jung, S. Cappel, S. Schorr, O. Ulucan, J. Linxweiler, J. Dudek, R. Blum, V. Helms, A.W. Paton, J.C. Paton, A. Cavalie, and R. Zimmermann, *BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca2+ leakage from the ER*. EMBO J, 2012. **31**(15): p. 3282-96.
- 104. Lièvremont, J.-P., R. Rizzuto, L.M. Hendershot, and J. Meldolesi, *BiP*, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca2+. The Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(December): p. 30873-30879.
- 105. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, *ER stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(9): p. a004424.
- 106. Ni, M., Y. Zhang, and A.S. Lee, *Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting.* Biochem J, 2011. **434**(2): p. 181-8.
- 107. Gonzalez-Gronow, M., A. Selim, J. Papalas, and S.V. Pizzo, *GRP78: A multifunctional receptor on the cell surface*. ANTIOXYDANTS & REDOX SIGNALING, 2009. **11**: p. 2299-2306.
- 108. Bertolotti, A., Y. Zhang, L.M. Hendershot, H.P. Harding, and R. D., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein-response*. Nature Cell Biology, 2000. **2**(June): p. 326-332.
- 109. Shen, J., X. Chen, L.M. Hendershot, and R. Prywes, *ER Stress Regulation of ATF6 Localization by dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals*. Developmental Cell, 2002. **3**: p. 99-111.
- 110. Zhu, G. and A.S. Lee, *Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis.* J Cell Physiol, 2015. **230**(7): p. 1413-20.

- 111. Carrara, M., F. Prischi, P.R. Nowak, M.C. Kopp, and M.M. Ali, *Noncanonical binding* of *BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling.* Elife, 2015. **4**.
- 112. Kimata, Y., D. Oikawa, Y. Shimizu, Y. Ishiwata-Kimata, and K. Kohno, *A role for BiP* as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. J Cell Biol, 2004. **167**(3): p. 445-56.
- Credle, J., J.S. Finer-Moore, F.R. Papa, R.M. Stroud, and P. Walter, *On the mecanism of sensing unfolded protein in the ensoplasmic reticulum*. PNAS, 2005. 102(December): p. 18773-18784.
- 114. Higa, A., S. Taouji, S. Lhomond, D. Jensen, M.E. Fernandez-Zapico, J.C. Simpson, J.-M. Pasquet, R. Schekman, and E. Chevet, *Endoplasmic reticulum stress-activated* transcription factor ATF6 requires the disulfide isomeras PDIA5 to modulate chemoresistance. Molecular and Cellular Biology, 2014. 34(May): p. 1839-1849.
- 115. Cox, J.S., C.E. Shamu, and P. Walter, *Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase*. Cell, 1993. **73**(June): p. 1197-1206.
- 116. Mori, K., W. Ma, M.-J. Gething, and J. Sambrook, *A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activityis required for signaling frome the ER to the nucleus.* Cell, 1993. **74**(August): p. 743-756.
- 117. Tirasophon, W., A.A. Welihinda, and R.J. Kaufman, A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. Genes and development, 1998.
 12: p. 1812-1824.
- 118. Zhou, J., C. Yin Liu, S. Hoon Back, R.L. Clark, D. Peisach, Z. Xu, and R.J. Kaufman, *The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response.* PNAS, 2006. 103(September): p. 14343-14348.
- 119. Tirasophon, W., K. Lee, B. Callaghan, A.A. Welihinda, and R.J. Kaufman, *The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response.* Genes and development, 2000. **14**: p. 2725-2736.
- 120. Calfon, M., H. Zeng, F. Urano, J.H. Till, S.R. Hubbard, H.P. Harding, S.G. Clark, and D. Ron, *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(January): p. 92-96.
- 121. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response.* Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(21): p. 7448-7459.
- 122. Oyadomari, S. and K. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*. Cell Death Differ, 2004. **11**: p. 381-389.
- 123. Yoshida, H., M. Oku, M. Suzuki, and K. Mori, *pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA* negatively regulates unfolded protein response activator *pXBP1(S)* in mammalian ER stress response. J Cell Biol, 2006. **172**(4): p. 565-75.
- 124. Harding, H.P., Y. Zhang, and D. Ron, *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase*. Nature, 1999. **397**(January): p. 271-274.
- 125. Harding, H.P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron, *PERK is essential for translational regulation and cell survival during unfolded protein response*. molecular Cell, 2000. **5**(May): p. 897-904.
- 126. Scheuner, D., B. Song, E. McEwen, C. Liu, R. Laybutt, P. Gillespie, T. Saunders, S. Bonner-Weir, and R.J. Kaufman, *Translational Control Is Required for the Unfolded Protein Response and In Vivo Glucose Homeostasis*. Molecular Cell, 2001. 7(June): p. 1165-1176.

- 127. Vattem, K.M. and R.C. Wek, *Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells.* PNAS, 2004. **101**(August): p. 11269-11274.
- 128. Harding, H.P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P.D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D.F. Stojdl, J.C. Bell, T. Hettmann, J.M. Leiden, and D. Ron, An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. Molecular Cell, 2003. 11(3): p. 619-633.
- 129. Ma, Y., J.W. Brewer, J. Alan Diehl, and L.M. Hendershot, *Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response.* Journal of Molecular Biology, 2002. **318**(5): p. 1351-1365.
- Ma, Y. and L.M. Hendershot, *Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2003. 278(37): p. 34864-73.
- 131. Marciniak, S.J., C.Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H.P. Harding, and D. Ron, *CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum*. Genes and development, 2004. **18**: p. 3066-3077.
- 132. Novoa, I., H. Zeng, H.P. Harding, and D. Ron, *Feedback inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2a.* the journal of cell biology, 2001. **153**(May): p. 1011-1021.
- 133. Jousse, C., S. Oyadomari, I. Novoa, P. Lu, Y. Zhang, H.P. Harding, and D. Ron, *Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells.* J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 767-75.
- 134. Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori, *Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins*. The Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(December): p. 33741-33749.
- 135. Kyosuke Haze, Hiderou Yoshida, Hideki Yanagi, Takashi Yura, and K. Mori, Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. Molecular Biology of the Cell, 1999. **10**: p. 3787-3799.
- 136. Jin Ye, Robert B. Rawson, Ryutaro Komuro, Xi Chen, Utpal P. Dave', Ron Prywes, Michael S. Brown, and J.L. Goldstein*[‡], *ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs*. Molecular Cell, 2000. 6: p. 1355-1364.
- 137. Shen, J. and R. 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.* J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 43046-51.
- 138. Schindler, A.J. and R. Schekman, *In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles*. PNAS, 2009. **106**(October): p. 17775-17780.
- 139. Adachi, Y., K. Yamamoto, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, and K. Mori, *ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum.* cell structure and function, 2008. **33**: p. 75-89.
- 140. Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, and K. Mori, *XBP1 mRNA Is Induced* by *ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor*. Cell, 2001. **107**(December): p. 881-891.
- 141. Okada, T., H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi, and K. Mori, *Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response*. Biochem J, 2002. **366**: p. 585-594.

- 142. Thuerauf, D.J., M. Marcinko, P.J. Belmont, and C.C. Glembotski, *Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22865-78.
- Shen, J., E.L. Snapp, J. Lippincott-Schwartz, and R. Prywes, *Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response*. Mol Cell Biol, 2005. 25(3): p. 921-32.
- 144. Sato, Y., S. Nadanaka, T. Okada, K. Okawa, and K. Mori, *Luminal domain of ATF6* alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi appartus. cell structure and function, 2011. **36**: p. 35-47.
- 145. Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H.P. Harding, and D. Ron, *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. Science, 2000. **287**(January): p. 664-666.
- 146. Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama, and M. Tohyama, Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. J Biol Chem, 2001. 276(17): p. 13935-40.
- 147. Yamaguchi, H. and H.G. Wang, *CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45495-502.
- 148. Schonthal, A.H., *Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy*. Scientifica (Cairo), 2012. 2012: p. 857516.
- 149. Puthalakath, H., L.A. O'Reilly, P. Gunn, L. Lee, P.N. Kelly, N.D. Huntington, P.D. Hughes, E.M. Michalak, J. McKimm-Breschkin, N. Motoyama, T. Gotoh, S. Akira, P. Bouillet, and A. Strasser, *ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim.* Cell, 2007. **129**(7): p. 1337-49.
- Oakes, S.A., L. Scorrano, J. Opferman, M.C. Bassik, M. Nishino, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer, *Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum*. PNAS, 2004. 102(January): p. 105-110.
- 151. Bajaj, G. and R.K. Sharma, *TNF-alpha-mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(4): p. 1558-64.
- 152. Kerbiriou, M., L. Teng, N. Benz, P. Trouve, and C. Ferec, *The calpain, caspase 12, caspase 3 cascade leading to apoptosis is altered in F508del-CFTR expressing cells.* PLoS One, 2009. 4(12): p. e8436.
- 153. Oakes, S.A. and F.R. Papa, *The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology*. Annu Rev Pathol, 2015. **10**: p. 173-94.
- 154. Wang, S. and R.J. Kaufman, *The impact of the unfolded protein response on human disease*. J Cell Biol, 2012. **197**(7): p. 857-67.
- 155. Moenner, M., O. Pluquet, M. Bouchecareilh, and E. Chevet, *Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10631-4.
- 156. Casas, C., *GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 177.
- 157. Scheper, W. and J.J. Hoozemans, *The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective.* Acta Neuropathol, 2015. **130**(3): p. 315-31.
- 158. Liu, M. and S.C. Dudley, Jr., *Role for the Unfolded Protein Response in Heart Disease and Cardiac Arrhythmias.* Int J Mol Sci, 2015. **17**(1).
- 159. Grootjans, J., A. Kaser, R.J. Kaufman, and R.S. Blumberg, *The unfolded protein response in immunity and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(8): p. 469-84.
- 160. Perera, N., J.L. Miller, and N. Zitzmann, *The role of the unfolded protein response in dengue virus pathogenesis*. Cell Microbiol, 2017. **19**(5).

- 161. Sarvani, C., D. Sireesh, and K.M. Ramkumar, *Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases*. Pharmacol Res, 2017. **119**: p. 412-421.
- 162. Marcinak, S.J. and D. Ron, *The unfolded protein response in lung disease*. Proc Am Thorac Soc, 2010. 7(6): p. 356-62.
- 163. Kelsen, S.G., *The Unfolded Protein Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Ann Am Thorac Soc, 2016. **13 Suppl 2**: p. S138-45.
- 164. Park, S.W. and U. Ozcan, *Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(3): p. 351-73.
- 165. Ojha, R. and R.K. Amaravadi, *Targeting the unfolded protein response in cancer*. Pharmacol Res, 2017. **120**: p. 258-266.
- 166. Schwarze, S. and V. Rangnekar, *Targeting plasma membrane GRP78 for cancer growth inhibition*. Cancer Biology & Therapy, 2014. **9**(2): p. 153-155.
- Xiao, G., T.-Z. Chung, H. Yung Pyun, R.E. Fine, and R.J. Johnson, *KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells*. Molecular Brain Research, 1999. 72: p. 121-128.
- 168. Zhang, Y., R. Liu, M. Ni, P. Gill, and A.S. Lee, *Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP.* J Biol Chem, 2010. **285**(20): p. 15065-75.
- 169. Booth, L., J.L. Roberts, and P. Dent, *HSPA5/Dna K may be a useful target for human disease therapies*. DNA Cell Biol, 2015. **34**(3): p. 153-8.
- 170. Schuit, F.C., P.A. In 'T Veld, and D.G. Pipeleers, *Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependant recruitment of pancreatic beta cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(June): p. 3865-3869.
- 171. Kataoka, H.U. and H. Noguchi, *ER Stress and beta-Cell Pathogenesis of Type 1 and Type 2 Diabetes and Islet Transplantation*. Cell Med, 2013. **5**(2-3): p. 53-7.
- 172. Boden, G., X. Duan, C. Homko, E.J. Molina, W. Song, O. Perez, P. Cheung, and S. Merali, *Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals.* Diabetes, 2008. **57**(9): p. 2438-44.
- 173. Fonseca, S.G., J. Gromada, and F. Urano, *Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(7): p. 266-74.
- 174. Lipson, K.L., S.G. Fonseca, S. Ishigaki, L.X. Nguyen, E. Foss, R. Bortell, A.A. Rossini, and F. Urano, *Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1*. Cell Metab, 2006. **4**(3): p. 245-54.
- 175. Liang, L., J. Chen, L. Zhan, X. Lu, X. Sun, H. Sui, L. Zheng, H. Xiang, and F. Zhang, *Endoplasmic reticulum stress impairs insulin receptor signaling in the brains of obese rats.* PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126384.
- 176. Ji, Y., Z. Zhao, T. Cai, P. Yang, and M. Cheng, *Liraglutide alleviates diabetic cardiomyopathy by blocking CHOP-triggered apoptosis via the inhibition of the IRE-alpha pathway.* Mol Med Rep, 2014. **9**(4): p. 1254-8.
- Julier, C. and M. Nicolino, *Wolcott-Rallison syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2010. 5: p. 29.
- 178. Hoozemans, J.J., E.S. van Haastert, D.A. Nijholt, A.J. Rozemuller, and W. Scheper, *Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease*. Neurodegener Dis, 2012. **10**(1-4): p. 212-5.
- 179. Rozpedek, W., L. Marklewicz, D.J. A., D. Pytel, and I. Majsterek, *Unfolded protein* response and PERK kinase as a new therapeutic target in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Curr. Med. Chem, 2015. 22: p. 3169-3184.
- 180. Radford, H., J.A. Moreno, N. Verity, M. Halliday, and G.R. Mallucci, *PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia.* Acta Neuropathol, 2015. **130**(5): p. 633-42.

- 181. Dadey, D.Y.A., V. Kapoor, A. Khudanyan, F. Urano, A.H. Kim, D. Thotala, and D.E. Hallahan, *ATF6 pathway of te ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma*. Oncotarget, 2015. 7(2): p. 2080-2092.
- 182. Galindo, I., B. Hernaez, R. Munoz-Moreno, M.A. Cuesta-Geijo, I. Dalmau-Mena, and C. Alonso, *The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e341.
- 183. Jin, J.K., E.A. Blackwood, K. Azizi, D.J. Thuerauf, A.G. Fahem, C. Hofmann, R.J. Kaufman, S. Doroudgar, and C.C. Glembotski, ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart. Circ Res, 2017. 120(5): p. 862-875.
- 184. Plate, L., R.J. Paxman, R.L. Wiseman, and J.W. Kelly, *Modulating protein quality control.* Elife, 2016. **5**: p. 1-4.
- 185. Gallagher, C.M., C. Garri, E.L. Cain, K.K. Ang, C.G. Wilson, S. Chen, B.R. Hearn, P. Jaishankar, A. Aranda-Diaz, M.R. Arkin, A.R. Renslo, and P. Walter, *Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6alpha branch*. Elife, 2016. **5**.
- 186. Ortega, A., E. Rosello-Lleti, E. Tarazon, C. Gil-Cayuela, F. Lago, J.R. Gonzalez-Juanatey, L. Martinez-Dolz, M. Portoles, and M. Rivera, *TRPM7 is down-regulated in both left atria and left ventricle of ischaemic cardiomyopathy patients and highly related to changes in ventricular function.* ESC Heart Fail, 2016. **3**(3): p. 220-224.
- 187. Paravicini, T.M., V. Chubanov, and T. Gudermann, *TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(8): p. 1381-4.
- 188. Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurosaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizhu, I. K., K. Imoto, and Y. Mori, *Molecular and Functional Characterization of a Novel Mouse Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP7*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(September): p. 27359-27370.
- 189. Park, H.S., C. Hong, B.J. Kim, and I. So, *The Pathophysiologic Roles of TRPM7 Channel*. Korean J Physiol Pharmacol, 2014. **18**(1): p. 15-23.
- 190. Oh, H.G., Y.S. Chun, C.S. Park, T.W. Kim, M.K. Park, and S. Chung, *Regulation of basal autophagy by transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel.* Biochem Biophys Res Commun, 2015. 463(1-2): p. 7-12.
- 191. Turlova, E., C.Y.J. Bae, M. Deurloo, W. Chen, A. Barszczyk, F.D. Horgen, A. Fleig, Z.-P. Feng, and H.-S. Sun, *TRPM7 Regulates Axonal Outgrowth and Maturation of Primary Hippocampal Neurons*. Mol Neurobiol, 2014.
- 192. Guilbert, A., M. Gautier, I. Dhennin-Duthille, P. Rybarczyk, J. Sahni, H. Sevestre, A.M. Scharenberg, and H. Ouadid-Ahidouch, *Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain.* Eur J Cancer, 2013. **49**(17): p. 3694-707.
- 193. Visser, D., M. Langeslag, K.M. Kedziora, J. Klarenbeek, A. Kamermans, F.D. Horgen, A. Fleig, F.N. van Leeuwen, and K. Jalink, *TRPM7 triggers Ca2+ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells*. Cell Calcium, 2013. **54**(6): p. 404-15.
- 194. Zhu, Y., R. Men, M. Wen, X. Hu, X. Liu, and L. Yang, *Blockage of TRPM7 channel induces hepatic stellate cell death through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis.* Life Sci, 2014. **94**(1): p. 37-44.
- 195. Li, X., X. Wang, Y. Wang, X. Li, C. Huang, and J. Li, *Inhibition of transient receptor* potential melastatin 7 (TRPM7) channel induces RA FLSs apoptosis through endoplasmic reticulum (ER) stress. Clin Rheumatol, 2014. **33**(11): p. 1565-74.
- 196. Wiuf, C., *DO deltaF508del heterozygotes have a selective advantage*? genet. res., camb., 2001. **78**: p. 41-47.

- 197. Quinton, P.M., *Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective*. Physiological reviews, 1999. **79**(January): p. S3-S22.
- 198. Lobitz, S. and E. Velleuer, *Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades*. Nat rev cancer, 2006. **6**(November): p. 893-898.
- 199. Andersen, D.H., *Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study.* Am J Dis Child., 1938. **56**: p. 344-399.
- 200. Andersen, D.H., *Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology*. Am J Dis Child., 1946. **72**: p. 62-80.
- 201. Gibson, L.E. and R.E. Cook, A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics, 1959. 23(3): p. 545-549.
- 202. di Sant'Agnese, P.A., R.C. Darling, G.A. Perera, and E. Shea, *Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas clinical significance and relationship to the disease*. Pediatrics, 1953. **12(5)**: p. 549-563.
- 203. Quinton, P.M., *Chloride impermeability in cystic fibrosis*. Nature, 1983. **301**(February): p. 421-422.
- 204. Knowles, M.R., J. Gatzy, and R.C. Boucher, *Increased bioelectric potential difference* across repiratory epithelia in cystic fibrosis. N Engl J Med, 1981. **305**(Dec): p. 1489-1495.
- 205. Tsui, L.C., M. Buchwald, D. Barker, J.C. Braman, R. Knowlton, J.W. Schumm, H. Eiberg, J. Mohr, D. Kennedy, N. Plavsic, M. Zsiga, D. Marklewicz, G. Akots, V. Brown, C. Helms, T. Gravius, C. Parker, K. Rediker, and H. Donis-Keller, *Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker*. Science, 1985. 230(November): p. 1054-1057.
- 206. Riordan, J.R., J.M. Rommens, B.-S. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.-L. Chou, M.L. Drumm, M.C. Iannuzzi, F.S. Collins, and L.C. Tsui, *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA*. Science, 1989. 245(September): p. 1066-1073.
- 207. Kerem, B.-S., J.M. Rommens, J.A. Buchanan, D. Marklewicz, T.K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L.C. Tsui, *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis.* Science, 1989. **245**(4922): p. 1073-1080.
- 208. Rommens, J.M., M.C. Iannuzzi, B.-S. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, M. Zsiga, M. Buchwald, J.R. Riordan, L.C. Tsui, and F.S. Collins, *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping.* Science, 1989. 245(September): p. 1059-1065.
- 209. Scotet, V., I. Dugueperoux, P. Saliou, G. Rault, M. Roussey, M.P. Audrezet, and C. Ferec, *Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France.* Orphanet J Rare Dis, 2012. 7: p. 14.
- 210. Farrell, P.M., *The prevalence of cystic fibrosis in the European Union*. J Cyst Fibros, 2008. **7**(5): p. 450-3.
- 211. Wilkens, S., *Structure and mechanism of ABC transporters*. F1000Prime Reports, 2015. 7(February): p. 1-9.
- Serohijos, A.W.R., T. Hegedus, A.A. Aleksandrov, L. He, L. Cui, N.V. Dokholyan, and J.R. Riordan, *Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function*. PNAS, 2008. 105(March): p. 3256-3261.
- 213. Mornon, J.P., B. Hoffmann, S. Jonic, P. Lehn, and I. Callebaut, *Full-open and closed CFTR channels, with lateral tunnels from the cytoplasm and an alternative position of the F508 region, as revealed by molecular dynamics.* Cell Mol Life Sci, 2015. **72**: p. 1377-1403.

- 214. Cant, N., N. Pollock, and R.C. Ford, *CFTR structure and cystic fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **52**: p. 15-25.
- 215. Hwang, T.C. and K.L. Kirk, *The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(1): p. a009498.
- 216. Moran, O., *The gating of the CFTR channel*. Cell Mol Life Sci, 2017. 74(1): p. 85-92.
- 217. Zielenski, J., R. Rozmahel, D. Bozon, B.-S. Kerem, Z. Grzelczak, J.R. Riordan, J.M. Rommens, and L.C. Tsui, *Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene.* Genomics, 1991. **10**: p. 214-228.
- 218. Lu, Y., X. Xiong, A. Helm, K. Kimani, A. Bragin, and W.R. Skach, Co- and Posttranslational Translocation Mechanisms Direct Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator N Terminus Transmembrane Assembly. The Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(January): p. 568-576.
- 219. Kim, S.J. and W.R. Skach, *Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 201.
- 220. Riordan, J.R., A.L. Lachapelle, J. Marshall, E.A. Higgins, and S.H. Cheng, *Characterization of the oligosaccharide structures associated with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.* Glycobiology, 2000. **10**: p. 1225-1233.
- 221. Stricher, F., C. Macri, M. Ruff, and S. Muller, *HSPA8/HSC70 chaperone protein:* structure, function, and chemical targeting. Autophagy, 2013. **9**(12): p. 1937-54.
- 222. Murata, S., T. Chiba, and K. Tanaka, *CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2003. **35**(5): p. 572-578.
- 223. Pranke, I.M. and I. Sermet-Gaudelus, *Biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **52**: p. 26-38.
- 224. Wang, X., J. Venable, P. LaPointe, D.M. Hutt, A.V. Koulov, J. Coppinger, C. Gurkan, W. Kellner, J. Matteson, H. Plutner, J.R. Riordan, J.W. Kelly, J.R. Yates, 3rd, and W.E. Balch, *Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis.* Cell, 2006. **127**(4): p. 803-15.
- 225. Farinha, C.M. and S. Canato, *From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(1): p. 39-55.
- 226. Riordan, J.R., *CFTR function and prospects for therapy*. Annu Rev Biochem, 2008. 77: p. 701-26.
- 227. Quinton, P.M., *Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis.* The Lancet, 2008. **372**(9636): p. 415-417.
- 228. Ehre, C., C. Ridley, and D.J. Thornton, *Cystic fibrosis: an inherited disease affecting mucin-producing organs.* Int J Biochem Cell Biol, 2014. **52**: p. 136-45.
- 229. Chandler, J.D. and B.J. Day, *Biochemical mechanisms and therapeutic potential of pseudohalide thiocyanate in human health.* Free Radic Res, 2015. **49**(6): p. 695-710.
- 230. Ikuma, M. and M.J. Welsh, *Regulation of CFTR Cl- Channel gating by ATP binding and hydrolysis.* PNAS, 2000. **97**(Kuly): p. 8675-8680.
- 231. Schultz, B.D., R.J. Bridges, and R.A. Frizzel, *lack of conventional ATPase properties in CFTR chloride channel gating*. J. Membrane Biol, 1996. **151**: p. 63-75.
- 232. Bargon, J., B.C. Trapnell, C.-S. Chu, E.R. Rosenthal, K. Yoshimura, W.B. Guggino, W. Dalemans, A. Pavirani, J.-P. Lecoq, and R.G. Crystal, *Down-Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Expression by Agents That Modulate IntracellularDivalentCations*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(April): p. 1872-1878.
- 233. Kunzelmann, K., *CFTR: interacting with everything*? News Physiol. Sci., 2001. **16**(August): p. 167-170.
- 234. Kunzelmann, K. and A. Mehta, *CFTR: a hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca2+*. FEBS J, 2013. **280**(18): p. 4417-29.

- 235. Chanoux, R.A. and R.C. Rubenstein, *Molecular Chaperones as Targets to Circumvent the CFTR Defect in Cystic Fibrosis.* Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 137.
- 236. Rubenstein, R.C. and P.L. Zeitlin, *Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DF508-CFTR*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**: p. C259-C267.
- 237. Norez, C., S. Noel, M. Wilke, M. Bijvelds, H. Jorna, P. Melin, H. DeJonge, and F. Becq, *Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat.* FEBS Lett, 2006. **580**(8): p. 2081-6.
- 238. Le Henaff, C., E. Hay, F. Velard, C. Marty, O. Tabary, P.J. Marie, and J.P. Jacquot, *Enhanced F508del-CFTR channel activity ameliorates bone pathology in murine cystic fibrosis.* Am J Pathol, 2014. **184**(4): p. 1132-41.
- 239. Nanua, S., U. Sajjan, S. Keshavjee, and M.B. Hershenson, *Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(1): p. 135-43.
- 240. Blohmke, C.J., M.L. Mayer, A.C. Tang, A.F. Hirschfeld, C.D. Fjell, M.A. Sze, R. Falsafi, S. Wang, K. Hsu, M.A. Chilvers, J.C. Hogg, R.E. Hancock, and S.E. Turvey, Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses. J Immunol, 2012. 189(11): p. 5467-75.
- 241. Pankow, S., C. Bamberger, D. Calzolari, S. Martinez-Bartolome, M. Lavallee-Adam, W.E. Balch, and J.R. Yates, 3rd, *F508 CFTR interactome remodelling promotes rescue of cystic fibrosis*. Nature, 2015. **528**(7583): p. 510-6.
- 242. Gomes-Alves, P., F. Couto, C. Pesquita, A.V. Coelho, and D. Penque, *Rescue of* F508del-CFTR by RXR motif inactivation triggers proteome modulation associated with the unfolded protein response. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(4): p. 856-65.
- 243. Bartoszewski, R., A. Rab, A. Jurkuvenaite, M. Mazur, J. Wakefield, J.F. Collawn, and Z. Bebok, *Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(4): p. 448-57.
- 244. Rab, A., R. Bartoszewski, A. Jurkuvenaite, J. Wakefield, J.F. Collawn, and Z. Bebok, *Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(2): p. C756-66.
- 245. Bartoszewski, R., A. Rab, G. Twitty, L. Stevenson, J. Fortenberry, A. Piotrowski, J.P. Dumanski, and Z. Bebok, *The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response*. J Biol Chem, 2008. 283(18): p. 12154-65.
- 246. Ward, C.L., S. Omura, and R.R. Kopito, *Degradation of CFTR by the Ubiquitin-Proteasome pathway.* Cell, 1995. **83**(October): p. 121-127.
- 247. Rowntree, R.K. and A. Harris, *The phenotypic consequences of CFTR mutations*. Annals of Human Genetics, 2003. **67**: p. 471-485.
- 248. Ferec, C. and G.R. Cutting, *Assessing the Disease-Liability of Mutations in CFTR*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(12): p. a009480.
- 249. Martin, C., C. Hamard, R. Kanaan, V. Boussaud, D. Grenet, M. Abely, D. Hubert, A. Munck, L. Lemonnier, and P.R. Burgel, *Causes of death in French cystic fibrosis patients: The need for improvement in transplantation referral strategies!* J Cyst Fibros, 2016. **15**(2): p. 204-12.
- 250. Lopes-Pacheco, M., *CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis.* Front Pharmacol, 2016. 7: p. 275.
- 251. Flume, P.A., *Pulmonary complications of cystic fibrosis*. Respiratory Care, 2009.
 54(May): p. 618-627.

- 252. Ratjen, F., S.C. Bell, S.M. Rowe, C.H. Goss, A.L. Quittner, and A. Bush, *Cystic fibrosis*. Nat Rev Dis Primers, 2015. 1: p. 15010.
- 253. Sathe, M.N. and A.J. Freeman, *Gastrointestinal, Pancreatic, and Hepatobiliary Manifestations of Cystic Fibrosis.* Pediatr Clin North Am, 2016. **63**(4): p. 679-98.
- 254. Radlovic, N., *Cystic fibrosis*. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo, 2012. **140**(3-4): p. 244-249.
- 255. Nick, J.A. and D.P. Nichols, *Diagnosis of Adult Patients with Cystic Fibrosis*. Clin Chest Med, 2016. **37**(1): p. 47-57.
- 256. Gibson-Corley, K.N., D.K. Meyerholz, and J.F. Engelhardt, *Pancreatic pathophysiology in cystic fibrosis*. J Pathol, 2016. **238**(2): p. 311-20.
- 257. Kobelska-Dubiel, N., B. Klincewicz, and W. Cichy, *Liver disease in cystic fibrosis*. Prz Gastroenterol, 2014. **9**(3): p. 136-41.
- 258. Kelly, T. and J. Buxbaum, *Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis*. Dig Dis Sci, 2015. **60**(7): p. 1903-13.
- Lissens, W., B. Mercier, H. Tournaye, M. Bonduelle, C. Ferec, S. Seneca, P. Devroey, S. Silber, A. Van steirteghem, and I. Liebaers, *Cystic fibrosis infertility caused by genital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities*. Hum Reprod, 1996. 11(Supplement 4): p. 55-80.
- 260. Tildy, B.E. and D.F. Rogers, *Therapeutic options for hydrating airway mucus in cystic fibrosis*. Pharmacology, 2015. **95**(3-4): p. 117-32.
- 261. Clancy, J.P., S.M. Rowe, F.J. Accurso, M.L. Aitken, R.S. Amin, M.A. Ashlock, M. Ballmann, M.P. Boyle, I. Bronsveld, P.W. Campbell, K. De Boeck, S.H. Donaldson, H.L. Dorkin, J.M. Dunitz, P.R. Durie, M. Jain, A. Leonard, K.S. McCoy, R.B. Moss, J.M. Pilewski, D.B. Rosenbluth, R.C. Rubenstein, M.S. Schechter, M. Botfield, C.L. Ordonez, G.T. Spencer-Green, L. Vernillet, S. Wisseh, K. Yen, and M.W. Konstan, *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, 2012. 67(1): p. 12-8.
- 262. Pettit, R.S. and C. Fellner, *CFTR modulators for the treatment of cystic fibrosis*. P&T, 2014. **39**: p. 500-511.
- 263. Kramer, E.L. and J.P. Clancy, *CFTR Modulator Therapies in Pediatric Cystic Fibrosis: Focus on Ivacaftor*. Expert Opin Orphan Drugs, 2016. **4**(10): p. 1033-1042.
- 264. Donaldson, S.H., G.M. Solomon, P.L. Zeitlin, P.A. Flume, A. Casey, K. McCoy, E.T. Zemanick, A. Mandagere, J.M. Troha, S.A. Shoemaker, J.F. Chmiel, and J.L. Taylor-Cousar, *Pharmacokinetics and safety of cavosonstat (N91115) in healthy and cystic fibrosis adults homozygous for F508DEL-CFTR*. J Cyst Fibros, 2017. 16(3): p. 371-379.
- 265. Brewington, J.J., G.L. McPhail, and J.P. Clancy, *Lumacaftor alone and combined with ivacaftor: preclinical and clinical trial experience of F508del CFTR correction*. Expert Rev Respir Med, 2016. **10**(1): p. 5-17.
- 266. Veit, G., R.G. Avramescu, D. Perdomo, P.W. Phuan, M. Bagdany, P.M. Apaja, F. Borot, D. Szollosi, Y.S. Wu, W.E. Finkbeiner, T. Hegedus, A.S. Verkman, and G.L. Lukacs, *Some gating potentiators, including VX-770, diminish DeltaF508-CFTR functional expression.* Sci Transl Med, 2014. 6(246): p. 246ra97.
- 267. Fajac, I. and K. De Boeck, *New horizons for cystic fibrosis treatment*. Pharmacol Ther, 2017. **170**: p. 205-211.
- 268. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
- 269. Del Porto, P., N. Cifani, S. Guarnieri, E.G. Di Domenico, M.A. Mariggio, F. Spadaro, S. Guglietta, M. Anile, F. Venuta, S. Quattrucci, and F. Ascenzioni, *Dysfunctional*

CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against Pseudomonas aeruginosa. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19970.

- 270. Kerbiriou, M., M.A. Le Drevo, C. Ferec, and P. Trouve, *Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(11-12): p. 1236-49.
- 271. Bodvard, K., J. Mohlin, and W. Knecht, *Recombinant expression, purification, and kinetic and inhibitor characterisation of human site-1-protease.* Protein Expr Purif, 2007. **51**(2): p. 308-19.
- 272. Okada, T., K. Haze, S. Nadanaka, H. Yoshida, N.G. Seidah, Y. Hirano, R. Sato, M. Negishi, and K. Mori, *A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31024-32.
- 273. Wang, N., D. Zhang, X. Mao, F. Zou, H. Jin, and J. Ouyang, *Astragalus polysaccharides* decreased the expression of *PTP1B* through relieving ER stress induced activation of *ATF6* in a rat model of type 2 diabetes. Mol Cell Endocrinol, 2009. **307**(1-2): p. 89-98.
- 274. Han, S.P., Y.H. Tang, and R. Smith, *Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives.* Biochem J, 2010. **430**(3): p. 379-92.
- 275. Dihazi, H., G.H. Dihazi, A. Bibi, M. Eltoweissy, C.A. Mueller, A.R. Asif, D. Rubel, R. Vasko, and G.A. Mueller, *Secretion of ERP57 is important for extracellular matrix accumulation and progression of renal fibrosis, and is an early sign of disease onset.* J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 16): p. 3649-63.
- 276. Dores-Silva, P.R., L.R. Barbosa, C.H. Ramos, and J.C. Borges, *Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization.* PLoS One, 2015. **10**(1): p. e0117170.
- 277. Singh, O.V., P.J. Mogayzel, C. Jozwik, H.B. Pollard, and P.L. Zeitlin, *Pharmacoproteomics of 4-Phenylbutyrate-Treated IB3-1 Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells.* Journal of Proteome Research, 2006. **5**: p. 562-571.
- 278. Singh, O.V., H.B. Pollard, and P.L. Zeitlin, *Chemical Rescue of F508-CFTR Mimics Genetic Repair in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells*. Mol Cell Proteomics, 2008. 7(6): p. 1099-1110.
- 279. Mayer, M.P., *Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(10): p. 507-14.
- 280. Yang, Y., S. Janich, J.A. Cohn, and J.M. Wilson, *The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**(October): p. 9480-9484.
- 281. Basile, A., M. Pascale, S. Franceschelli, E. Nieddu, M.T. Mazzei, P. Fossa, M.C. Turco, and M. Mazzei, *Matrine modulates HSC70 levels and rescues DeltaF508-CFTR*. J Cell Physiol, 2012. **227**(9): p. 3317-23.
- 282. Freedman, R.B., T.R. Hirst, and M.F. Tuite, *Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding*. TIBS, 1994. **19**(August): p. 331-336.
- Ryu, K.-Y., R. Maehr, C.A. Gilchrist, M.A. Long, D.M. Bouley, B. Mueller, H.L. Ploegh, and R.R. Kopito, *The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance.* The EMBO Journal, 2007. 26: p. 2693-2706.
- 284. Trouve, P., E. Genin, and C. Ferec, *In silico search for modifier genes associated with pancreatic and liver disease in Cystic Fibrosis.* PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173822.

- 285. Ryazanova, L.V., L.J. Rondon, S. Zierler, Z. Hu, J. Galli, T.P. Yamaguchi, A. Mazur, A. Fleig, and A.G. Ryazanov, *TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals*. Nat Commun, 2010. 1: p. 109.
- 286. Oancea, E., J.T. Wolfe, and D.E. Clapham, *Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow.* Circ Res, 2006. **98**(2): p. 245-53.
- 287. Li, W.T., S.Y. Zhang, Y.F. Zhou, B.F. Zhang, Z.Q. Liang, Y.H. Liu, Y. Wei, C.K. Li, X.J. Meng, M. Xia, Y. Dan, and J.N. Song, *Carvacrol attenuates traumatic neuronal injury through store-operated Ca(2+) entry-independent regulation of intracellular Ca(2+) homeostasis*. Neurochem Int, 2015. **90**: p. 107-13.
- 288. Zhou, S., A. Takai, and Y. Okada, *Regulation of cardiac CFTR Cl(-) channel activity* by a Mg(2+)-dependent protein phosphatase. Pflugers Arch, 2002. **444**(3): p. 327-34.
- 289. Rao, J., S. Yue, Y. Fu, J. Zhu, X. Wang, R.W. Busuttil, J.W. Kupiec-Weglinski, L. Lu, and Y. Zhai, *ATF6 mediates a pro-inflammatory synergy between ER stress and TLR activation in the pathogenesis of liver ischemia-reperfusion injury*. Am J Transplant, 2014. **14**(7): p. 1552-61.
- 290. Kim, B.J., J.H. Nam, Y.K. Kwon, I. So, and S.J. Kim, *The Role of Waixenicin A as Transient Receptor Potential Melastatin 7 Blocker*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2013. **112**(August): p. 83-89.
- 291. Zierler, S., G. Yao, Z. Zhang, W.C. Kuo, P. Porzgen, R. Penner, F.D. Horgen, and A. Fleig, Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. J Biol Chem, 2011. 286(45): p. 39328-35.
- 292. Xu, T., B.M. Wu, H.W. Yao, X.M. Meng, C. Huang, M.M. Ni, and J. Li, *Novel insights into TRPM7 function in fibrotic diseases: a potential therapeutic target.* J Cell Physiol, 2015. **230**(6): p. 1163-9.

ANNEXES

Au cours de ma thèse j'ai également eu l'opportunité d'avoir pu apporter une petite contribution à deux autres articles scientifiques :



Cell Calcium 62 (2017) 47-59



Contents lists available at ScienceDirect

Cell Calcium



journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca

Calumenin contributes to ER-Ca²⁺ homeostasis in bronchial epithelial cells expressing WT and F508del mutated CFTR and to F508del-CFTR retention



Réginald Philippe^{a,1}, Fabrice Antigny^{b,c,d,1}, Paul Buscaglia^a, Caroline Norez^c, Florentin Huguet^a, Cyril Castelbou^d, Pascal Trouvé^a, Frédéric Becq^c, Maud Frieden^d, Claude Férec^a, Olivier Mignen^{a,*}
Florentin HUGUET

73, rue Jean Jaurès 29200 Brest Tél : 06.31.14.29.92 Mail : <u>florentin.huguet@gmail.com</u> Researchgate.net/profile/Florentin_Huguet Né le 22/12/1988 à Saint-Nazaire (44)

PARCOURS UNIVERSITAIRE

| 2013/2017 | <u>Doctorat</u> de Biologie, spécialité génétique humaine, génétique épidémiologique et fonctionnelle, biotechnologies. Inserm UMR-1078, CHRU Morvan et Université de Bretagne Occidentale, Brest (29) |
|--------------|---|
| 2012/2013 | <u>Master 2</u> Génétique, Génomique et Biotechnologies, mention AB UFR Médecine, Université de Bretagne Occidentale, Brest (29) |
| Janvier 2012 | Formation diplômante d'Expérimentation Animale Niveau 1 ONIRIS - Ecole vétérinaire de Nantes (44) |
| 2011/2012 | <u>Master 2</u> Physiologie des Régulations, mention AB <i>UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale, Brest (</i> 29) |
| 2010/2011 | <u>Master 1</u> Biologie et Santé, spécialité Physiologie Animale et Humaine, mention AB UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale, Brest (29) |
| 2007/2010 | Licence de Biologie Générale, spécialité Physiologie Animale et Humaine, mention AB UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne-Sud, Vannes (56) |

SITUATION ACTUELLE

Actuellement en dernière année de doctorat à l'UBO. « Implication de la voie ATF6 dans la mucoviscidose ». La soutenance de thèse se déroulera en Juin 2017.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Octobre 2013-Juin 2017 : Doctorat de Biologie Moléculaire et Biomédicale (3 ans et 6 mois) Inserm UMR-1078, Brest (29) Objectifs : Etude de l'implication de la voie ATF6 dans la mucoviscidose, et étudier l'effet d'une molécule correctrice sur le transport à la membrane du CFTR-F508del. Directeur de thèse : Pascal Trouvé Co-directeur de thèse : Mathieu Kerbiriou Directeur du laboratoire : Pr. Claude Férec

Janvier-Juin 2013 : Stage de Master 2 (6 mois) Inserm UMR-1078, Brest (29) <u>Objectifs</u> : Etude des interactions entre ATF6, NUCB1 et S1P sur un modèle de pathologie : la mucoviscidose. <u>Encadrant</u> : Mathieu Kerbiriou <u>Directeur du laboratoire</u> : Pr. Claude Férec Janvier-Juin 2012 : Stage de Master 2 (6 mois) Laboratoire IFREMER (PFOM-ARN), Brest (29) <u>Objectifs</u> : Mise au point d'une technique de dosages de nouveaux marqueurs du métabolisme énergétique chez la sole commune (*Solea solea*). <u>Encadrant</u> : David Mazurais <u>Directeur du laboratoire</u> : José Zambonino

Janvier-Février 2011 : Stage de Master 1 (2 mois) Laboratoire ORPHY, Brest (29) Objectifs : Etude de l'impact d'un stress chimique et de ses interactions avec un stress thermique sur le flet (Platichthys flesus) Encadrant : Michaël Théron Directeur du laboratoire : Philippe Sébert

ARTICLES SCIENTIFIQUES

6/7 – Un article en position intermédiaire portant sur la signalisation calcique dans la pancréatite chronique sont en cours de realisation.

4/5 – Deux articles scientifiques portant sur l'implication de l'UPR et de la voie ATF6 dans la mucoviscidose (F508del) sont actuellement en cours de soumission.

3 – Réginald Philippe, Fabrice Antigny, Paul Buscaglia, Caroline Norez, **Florentin Huguet**, Cyril Castelbou, Pascal Trouvé, Frédéric Becq, Maud Frieden, Claude Férec, Olivier Mignen. *Calumenin contributes to ER-Ca2+ homeostasis in bronchial epithelial cells expressing WT and F508del mutated CFTR and to F508del-CFTR retention*. Cell Calcium, February 2017. DOI : 10.1016/j.ceca.2017.01.011

2 – **Huguet F**, Calvez ML, Benz N, Le Hir S, Mignen O, Buscaglia P, Horgen FD, Férec C, Kerbiriou M and Trouvé P. *Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing DF508-CFTR and G551D-CFTR.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2016.

1 – Pascal Trouvé, Marie-Laure Calvez, Stéphanie Moisan, Sophie Le Hir, **Florentin HUGUET**, Nathalie Benz, Mathieu Kerbiriou and Claude Férec. *Rapid detection of the mature form of cystic fibrosis transmembrane regulator by surface plasmon resonance*. Anal. Methods, 2015, 7, 226.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- HUGUET F., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. *Implication de la voie ATF6 de l'UPR dans la mucoviscidose*. Colloque annuel IBSAM (Brest, France, 11 Juin 2015). Présentation orale

- **HUGUET F**., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. *Etude de l'implication de l'UPR dans la mucoviscidose (2 ème partie).* 16 ème Colloque des Jeunes Chercheurs (Paris, France, 16 et 17 Février 2015). Poster

- HUGUET F., Calvez M-L., Benz N., Le Hir S., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. *Implication de l'UPR dans la mucoviscidose*. Journée de l'Inserm 2015 (Logonna-Daoulas, France, 8 Septembre 2014). Poster

- **HUGUET F**., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. Etude de l'implication de l'UPR dans la mucoviscidose (1 ère partie). 15 ème Colloque des Jeunes Chercheurs (Paris, France, 17 et 18 Février 2014). Poster - HUGUET F., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. *Etude de l'interaction de S1P, NUCB1 et ATF6 : implications pour la mucoviscidose*. 16 ème Journée de Jeunes Chercheurs de la SFR ScinBios (Brest, France, 29 Novembre 2013). Poster

COMPETENCES EN BIOLOGIE :

Biologie cellulaire :

- Culture bactérienne, transformations bactériennes
- Culture de lignées cellulaires humaines
- Transfections de plasmides et ARNi sur cellules eucaryotes
- Test de viabilité cellulaire
- Mesure oxymétrique sur tissus isolés

Biologie moléculaire :

- Extraction et purification d'ADN et ARN
- Q-PCR
- Electrophorèse (BET, GelRed...)
- Séquençage ADN
- Lyse cellulaire et dosage protéique
- Western blot, co-immunoprécipitation, ELISA, Biotinylation
- Purification de protéine (FPLC AKTA[®])
- Etude d'interactions protéiques : Résonnance plasmonique de surface (Biacore[®])

BREVETS : Brevet (dépôt en cours) portant sur deux molécules potentiellement thérapeutiques et applicables à la mucoviscidose F508del.



INFORMATIQUE :

- Maîtrise des différents systèmes d'exploitation (Windows, Mac, Linux)
- Maîtrise des suites Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint...) et équivalents libres
- Utilisation de logiciels de traitements d'images (ImageJ, Bio1D, Infinity...)

COMPETENCES PERSONNELLES :

- Facilité d'adaptation
- Facilité d'écriture et de synthèse
- Bonne capacité de mémorisation
- Facilité à travailler en équipe
- Curiosité scientifique
- Sociable

LOISIRS :

- Plongée sous-marine en bouteille Niveau 2 PADI
- Course à pied, Badminton
- Cinéma
- Physique, chimie





Objectifs

Etudier l'UPR, et plus précisément la voie ATF6, afin de préciser le mécanisme d'inhibition du CFTR par ATF6, ainsi que le rôle inhibiteur de NUCB1 sur ATF6 :

Etude de l'expression des différentes protéines d'intérêt
 Etude des interactions entre ATF6, S1P et NUCB1



Conclusions - Perspectives

- Les résultats montrent que plusieurs protéines de l'UPR telles que BiP et ATF6 sont surexprimées dans les cellules HeLa-F508del et CFBE F508del par rapport aux cellules WT, prouvant que l'UPR est déclenchée dans les cellules exprimant CFTR-F508del, confirmant les résultats obtenus auparavant dans A549-F508del.
 D'autre part, la surexpression de NUCB1 dans les cellules exprimant un CFTR-F508del est en accord avec la littérature et notamment le rôle de régulateur négatif de l'UPR par NUCB1.
- par NUCB1.
 Des expériences d'inhibition et de surexpression de ces différentes protéines sont en cours de réalisation et permettront de mieux comprendre ce complexe protéique incluant ATF6, S1P et NUCB1, dans un contexte de mucoviscidose (F508del).
- Grâce à des techniques telles que la 2D et la spectroscopie de masse, l'objectif est d'identifier de nouveaux partenaire protéiques impliqués dans la voie ATF6, mais également de mieux comprendre les différentes interactions protéiques existantes au sein de ce complexe.
- Une meilleure compréhension des interactions protéiques mises en jeu dans la régulation du CFTR par ATF6 ouvrira, à terme, de nouvelles voies d'investigation sur la possibilité de lever la répression transcriptionnelle d'ATF6 sur le CFTR et fournira peut-être un moyen efficace d'améliorer l'état de santé de patients atteints d'une maladie dite « conformationnelle » telle que la mucoviscidose.

Impact de la modulation de TRPM7 et ATF6 sur le cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

La mucoviscidose est une maladie causée par des mutations du gène *cftr* entraînant des défauts importants de la protéine CFTR. La mutation la plus fréquente (F508del) est caractérisée par un repliement incorrect conduisant à la rétention de la protéine dans le RE. L'accumulation de CFTR-F508del dans le RE, l'inflammation et les infections vont déclencher un stress du RE dans les cellules épithéliales ainsi que l'UPR. Cette dernière est une réponse adaptative déclenchée par le stress du RE et permet de rétablir l'homéostasie de ce compartiment. L'UPR est constituée de trois voies majeures dont l'une d'entre elles est activée dans les cellules exprimant un CFTR-F508del. Il s'agit de la voie ATF6 qui est de plus responsable de la répression transcriptionnelle du CFTR, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle. Nous avons montré que son inhibition conduit à l'amélioration de la fonction du CFTR-F508del et à l'augmentation de sa présence à la membrane des cellules.

Nous nous sommes également intéressés au Mg²⁺ et au TRPM7, le régulateur principal de la $[Mg^{2+}]_i$ dans les cellules. Nous avons émis l'hypothèse que TRPM7 était en partie responsable de l'activation d'ATF6 dans les cellules exprimant un CFTR-F508del. Le but de cette seconde partie du projet était donc tout d'abord d'étudier la relation existante entre le Mg²⁺, TRPM7 et le CFTR. Nous avons montré qu'il existait des différences de $[Mg^{2+}]_i$ selon le type de mutation du CFTR exprimé par les cellules. Ces différences sont en partie dues à un défaut d'activation de TRPM7, lui-même probablement lié à un défaut du CFTR. En augmentant l'activité de TRPM7 par du Naltriben, nous avons pu montrer un effet potentialisant sur le CFTR-G551D.

Mots-clés : Mucoviscidose, CFTR, F508del, UPR, TRPM7, Mg²⁺

Impact of TRPM7 and ATF6 modulation on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Cystic fibrosis is caused by mutations in the *cftr* gene resulting in several defaults on the CFTR protein. The most frequent mutation is F508del which is characterized by an incorrect folding causing its retention within the ER. CFTR-F508del protein accumulation in the ER, inflammation and infections will trigger the ER stress in epithelial cells, as well as UPR. UPR constitutes an adaptive response of the ER in order to restore ER's homeostasis. UPR consists in three major pathways. Among them, one is activated in cells expressing CFTR-F508del protein. The ATF6 pathway of UPR is responsible of the transcriptional repression of CFTR, which makes of it a potential therapeutic target. We showed that the inhibition of ATF6 leads to the improvement of CFTR-508del function, as well as its increased presence in the cellular membrane. We were also interested in Mg²⁺ and TRPM7, the main regulator of [Mg²⁺]_i. We suspected that TRPM7 is, at least in part, responsible for the activation of ATF6 in cells expressing the mutant CFTR-F508del. Thus, the second part of my work was focused on the study of the relationship between Mg^{2+} , TRPM7 and CFTR. We showed the existence of $[Mg^{2+}]_i$ differences according to CFTR mutant expressed in cells. These differences are the result of an altered TRPM7 activation, probably in link with the mutated CFTR's malfunction. We proved that increasing TRPM7 activity by Naltriben treatment potentiates CFTR-G551D.

Keywords : *Cystic fibrosis, CFTR, F508del, TRPM7, Mg*²⁺

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE



universite de bretagne occidentale

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne pour obtenir le titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE Mention : Biologie-Santé École Doctorale SICMA

présentée par

Florentin Huguet

Préparée à l'Institut national de la santé et de la recherche médicale, UMR 1078,

Impact de la modulation de
TRPM7 et d'ATF6 sur le
cystic fibrosisFabienn
ProfesseOlivier T
Docteur,
Docteur,

transmembrane conductance regulator.

Thèse soutenue le 29 Juin 2017 devant le jury composé de :

Fabienne FOUFELLE Professeur, Paris VI - UMRS 1138 / Rapporteur

Olivier TABARY Docteur, Paris VI – UMRS 938 / Rapporteur

Nicolas PALLET Docteur, Paris V - UMRS 1147 / Examinateur

Marc BLONDEL Professeur, UBO – Inserm UMR 1078 / Examinateur

Claude FEREC Professeur, UBO – Inserm UMR 1078 / Examinateur

Pascal TROUVE Docteur, Inserm UMR 1078 / Directeur de thèse

Mathieu KERBIRIOU Docteur, UBO – Inserm UMR 1078 / Co-encadrant de thèse Cette thèse a été effectuée sous la direction du Docteur Pascal Trouvé et co-encadrée par le Docteur Mathieu Kerbiriou, au sein de l'UMR 1078 à Brest. Ce projet a pu être réalisé grâce au soutien financier de l'Inserm, de la Région Bretagne, et des associations Gaëtan Saleün et Vaincre la Mucoviscidose.





Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury d'avoir consacrer le temps nécessaire à l'évaluation de ce travail. Je remercie le Dr. Fabienne Foufelle et le Dr. Olivier Tabary d'avoir pris le temps d'examiner ce manuscrit. Je remercie également le Dr. Nicolas Pallet, le Pr. Marc Blondel et le Pr. Claude Férec d'avoir accepté d'être examinateur de cette soutenance de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Claude Férec une seconde fois pour m'avoir donné la chance d'effectuer cette thèse dans son laboratoire. J'en profite pour souhaiter un excellent mandat au Dr. Emmanuelle Génin, succédant au Pr. Férec au poste de directrice de l'unité.

Je tiens également à remercier l'association Gaëtan Saleün et son président René Vigouroux pour les six mois supplémentaires. Je remercie également Marie-Aude, qui par son travail permet également à cette association d'être impliquée plus que jamais dans la lutte contre la mucoviscidose.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse le Dr. Pascal Trouvé sans qui rien de tout ceci n'aurait été possible. Merci de m'avoir offert l'immense opportunité d'intégrer ton groupe en tant que thésard. Merci pour tous ces conseils (plus ou moins précieux) que tu as su me donner aux moments opportuns, de m'avoir fait découvrir la science sous un autre angle, beaucoup moins conventionnel. Merci de m'avoir aiguillé dans les moments de flottements. J'espère vraiment que tous les projets scientifiques que tu as en tête se concrétiseront mais je n'ai pas trop de doute là-dessus. Merci également de m'avoir fait confiance de m'avoir donné la chance de réaliser six mois supplémentaires, bien utiles à la concrétisation de cette thèse. J'espère aussi qu'à l'avenir toi et tes étudiants n'auront plus de problème avec le service de sécurité de la fac. Pour finir j'ai été ravi de partager avec toi tous ces moments café/clope (ratio 1 : 18) à parler de tout sauf de science (si un peu quand même).

Je remercie également très chaleureusement mon co-encadrant de thèse le Dr. Mathieu Kerbiriou. Une fois n'est pas coutume je te remercie pour toutes ces nouvelles choses que tu as mis dans ma besace durant ces quatre années. Je te remercie tout d'abord d'avoir accepté ma candidature en stage de Master 2. En second lieu je te remercie surtout pour le temps que tu as pu consacrer à ce projet malgré ton emploi du temps de cours surchargé. Je te remercie également pour la première correction de cette thèse. Merci d'avoir pris le temps de corriger les très nombreuses fautes d'orthographe et étourderies ainsi que tout le reste en parallèle de l'énorme paquet de copie que tu as à corriger.

Je remercie chaleureusement mes deux collègues de bureau : HaineB et MLC. Il faut bien avouer que vous n^2 êtes pas très faciles à vivre tous les jours. Merci pour tous les conseils que vous avez pu

m'apporter au cours de ces quatre années de vie commune, ainsi que les bons moments partagés. Merci de m'avoir supporté durant ces quatre années et par-dessus tout merci d'avoir su ancrer en moi la passion du nettoyage de labo...Je te souhaite bonne continuation sous les tropiques ML en espérant que ton projet se concrétise ! Quant à toi Benz(N) j'espère que la nouvelle organisation du laboratoire ne va pas trop bouleverser ton quotidien et que tu vas pouvoir continuer de diriger le labo d'une main de fer. Et bon courage avec les petits nouveaux.

Je remercie également BB et DD, deux amis formidables. Merci pour votre bonne humeur et ces excellents moments passés ensemble. On vous attend à Paname !! Faudrait que vous appeliez votre gosse genre Cédric ça ferait la suite BB, CC et DD ! Bisous et merci à vous les ptis culs !!

Je remercie Paul et je te souhaite bonne chance pour ta thèse. Je remercie également ses deux coéquipiers : Marjo et Régie !! Marjocotton bon courage pour la fin de thèse et la suite, et continue de garder ton sens critique aussi affuté qu'il l'est. Régie, bientôt un an que tu as fini et que tu me fournis en conseil plus qu'utile à une fin de thèse. Merci pour toutes ces conversations relativement inutiles de fin de soirée, et j'espère que tes futures recherches seront fructueuses. J'en profite pour remercier l'ensemble de feue l'équipe CSC, Olivier, Christophe et les trois stagiaires : Néné, Anne Banet et Nadja.

Pupu et Flo, merci à vous de m'avoir fait découvrir Brest ainsi qu'une portion de ses habitants avec qui j'ai passé de très bons moments. Quant à vous deux, on va bientôt se revoir ça ne fait aucun doute, continuant de se faire des soirées de vieux maintenant que vous êtes trois. Plus sérieusement, merci sincèrement à vous deux pour tous ces bons moments passés ensemble, en espérant que cela continue.

Je tiens à dire merci à Mohamed : « Merci à Mohamed !! » (Grosse blague, vla le veauni huya !!). Bref, s'il y a bien une personne que l'on doit tous féliciter ici c'est bien toi, parce que pour nous avoir supporter pendant quatre ans en soirée sans jamais avoir quécra, fallait se lever de bonheur (assez paradoxal puisque ce n'est pas ton cas) !! A titre plus personnel, merci d'avoir tenté de m'apprendre ce qu'est un rythme musical et surtout merci pour toutes ces discussions de fin de soirée plus que fructueuses (la plupart du temps) ! Je te souhaite bonne chance pour ta fin de thèse mais bon tkt barquette !! Non mais promis c'était la dernière fois que j'essayais de parler comme toi, je vois bien que ça le fait pas aussi bien.

Si je n'avais pas su que tu faisais une thèse, je pense que je t'aurais facilement imaginé fromager ma Kikinette. Merci pour ton enthousiasme, ton humour (quand tu n'es pas malade ni fatigué) et merci pour les bons moments passés entre Brest et Donges et à Brest-même. Bon courage avec tous tes projets dans le bâtiment !! Je remercie le reste des membres du laboratoire de neuro que j'ai eu le plaisir de rencontrer, Katell, Christelle, Olivier et leurs collègues. Je tiens à remercier Jérôme, Christelle et Maxime du 54 Café pour leur soutien « moral(coolisé) » durant ces deux dernières années de thèse. Merci pour les parties de fléchettes, les pintes, les vodkas, les shots, et autres stimulants qui nous ont détendu et permis de tenir le coup dans les moments sombres.

Même si ce grand Monsieur ne lira probablement jamais ça je remercie le Pr. Pierre « Piotr » Lehn tout d'abord pour ces petits cours improvisés mais néanmoins très instructifs de biologie moléculaire, pour toutes ces fabuleuses histoires narrées au repas de midi à la cafète. Merci également pour les blagues (plus que douteuses) racontées au pas d'une porte, et surtout merci d'avoir su rester humble malgré vos nombreux talents.

Je remercie particulièrement Catherine et Laurent Corcos de l'équipe ECLA. Merci pour leurs nombreux conseils concernant cette m**** de culture cellulaire. Merci pour tout le matos prêté, la centri et surtout les divers conseils en matière de proto. Bon courage pour la suite et qu'ECLA perdure !! Je remercie aussi les deux dames de cette équipe : Lieutenant Dan et Brigitte.

Je remercie l'équipe des levures (YL) pour les bons moments passés ensemble ainsi que les nombreux échanges que l'on a pu avoir. Faudrait penser à embaucher des mecs ceci dit, on se sentirait moins seul. Merci à Marc, Cécile, Gaëlle, petit Olo, Flavy, Nadège, Hélène, Alice, Rustine, etc.

Je remercie les membres de la thérapie génique : Tristan, Yannou, Tony et Angélique.

Je remercie Sophie et Mimi pour les nombreux services rendus, je pense que cette unité vous doit beaucoup et moi également. Dans le même esprit, je remercie également Michelle Kerleroux pour toutes les aides de dernière minute, merci de n'avoir jamais raccroché le téléphone et merci d'avoir évité que la fin de thèse ne devienne un cauchemar administratif. Je remercie au passage l'école doctorale SICMA, pour l'organisation et les moyens mis en œuvre dans les diverses formations proposées et le bien-être de ses étudiants. Je remercie toutes ces personnes tapies dans l'ombre administrative (Valérie, Rozenn) de faire tourner la boutique et venir en aide aux étudiants.

Je remercie toutes les personnes que j'ai pu côtoyer de près ou de loin durant ces quatre années : Sophie, Chan (Clonus), Manu du séquençage, Laura, Adeline, M. Boule, Patrick, Didier du ménage, la dame de la sécurité, Réné des dentaires, Fred de physio, les sages-femmes Francine et Béa, Anthony du bad (et de la repro), les stagiaires (Marlène, Marion, Benoît, Emile, Elise et tous ceux que j'ai oublié) d'une aide si précieuse, ainsi que tous les membres de l'UMR-1078.

Peut-être que tu es toujours en train de chercher la suite des remerciements que j'ai écrit pour toi ou tu es simplement dèg pour la pauvre phrase que j'ai écrite et tu t'es cassé (je te connais) !! Toujours est-il

que la suite est là et je te remercie tout d'abord d'avoir apporté au laboratoire (en même temps que ton gros cul) ta bonne humeur, ta générosité, ton altruisme, ta philanthropie, ta magnanimité (si tu ne sais pas ce que ça veut dire tu cherches !!). Il est certitude qu'un jour nos chemins se sépareront, le plus tard possible je l'espère...

Je voudrais remercier le Dr. Maria-José Lista pour avoir rendu cette dernière année de thèse aussi belle et mouvementée qu'elle le fut. Merci déjà pour tous tes conseils en matière de technique de laboratoire. Merci pour l'ouverture d'un marché noir spécialisé dans la vente de réactifs de labo entre nos différentes équipes. Au-delà de ça et d'un point de vue plus personnelle je tiens à te remercier de rendre tous ces petits moments qu'on passe ensemble aussi simples et merveilleux soient-ils, de me faire rire tous les jours, d'être aussi attentionnée et surtout de pas être une vraie fille chiante. Ton soutient, tes envies permanentes de faire la fête et de danser, ta bonne humeur, tes blagues nulles, ta manière de parler le français, ton impulsivité, ton intelligence, tes habitudes, tes goûts font qu'aujourd'hui tu es ma *gordita*. TAMYPSMGDA/TEMPS

Je tiens également à remercier mes deux sœurs, Sœur 1 (Mathilde) et Sœur 2 (Amandine), sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour...ah non en fait je serai quand même là sans vous !! Plus sérieusement merci à toutes les deux pour tout le reste.

Pour finir je tiens à remercier infiniment et le plus sincèrement du monde Père et Mère de m'avoir permis d'être ici aujourd'hui, c'est entièrement grâce à vous alors un grand MERCI pour tout ça !! Un jour promis quand je serai devenu un adulte responsable je vous rendrai la pareille.

Table des matières

| Reme | rcieme | nts | ii |
|---------|----------|--|-----|
| Table | des ma | atières | i |
| Liste o | des abr | éviations | iii |
| Table | des illu | istrations | v |
| INTRC | DUCTI | ON | 0 |
| I. L | e réticu | ulum endoplasmique | 1 |
| a. | Géné | ralités | 1 |
| b. | Rôles | du réticulum endoplasmique granuleux | 2 |
| | a) | Biosynthèse protéique | 2 |
| | b) | Repliement des protéines | 8 |
| | c) | Protéines chaperonnes et contrôle qualité | 8 |
| | d) | Le système ERAD | 12 |
| II. L | .'Unfold | ded Protein Response | 17 |
| a. | Géné | ralités | 17 |
| | a) | Découverte | 17 |
| | b) | Inducteurs de l'UPR | 18 |
| b. | Rôle (| général de l'UPR | 19 |
| c. | Les di | ifférents effecteurs de l'UPR | 20 |
| | a) | BiP | 20 |
| | b) | IRE1 | 25 |
| | c) | PERK | 27 |
| | d) | ATF6 | 29 |
| | e) | Induction de l'apoptose par l'UPR | 31 |
| d. | Patho | ologies impliquant le stress du RE et l'UPR et traitements possibles | 32 |
| | a) | Exemple de l'implication de BiP dans certains cancers | 33 |
| | b) | Exemple de la voie IRE1 dans le diabète de type 2 | 33 |
| | c) | Exemple de PERK dans la maladie d'Alzheimer | 34 |
| | d) | Exemple d'ATF6 dans l'ischémie-reperfusion | 35 |
| III. | La mu | ucoviscidose | 38 |
| a. | Géné | ralités | |
| | a) | La mucoviscidose à travers le temps | |
| | b) | et à travers le monde | 39 |
| b. | Le gè | ne <i>cftr</i> et la protéine CFTR | 42 |
| | a) | Structure et fonctionnement de la protéine CFTR | 42 |
| | b) | Biogénèse et contrôle qualité du CFTR | 45 |

| | c) | Principales fonctions du CFTR49 | | |
|---------------|--|--|--|--|
| с. | Le CF | e CFTR F508del5: | | |
| | a) | Généralités51 | | |
| | b) | CFTR-F508del et UPR53 | | |
| d. | Les at | tteintes54 | | |
| | a) | Respiratoires | | |
| | b) | Digestives | | |
| | c) | Génitales | | |
| e. | Théra | pies protéiques du CFTR58 | | |
| | a) | Correcteurs | | |
| | b) | Potentiateurs | | |
| | c) | Stabilisateurs60 | | |
| | d) | Associations de classes de médicaments61 | | |
| PROBL | EMAT | IQUES DE LA THESE62 | | |
| RESUL | TATS | 65 | | |
| I. P | I. Partie 1 : ATF6 dans la mucoviscidose | | | |
| II. P | artie 2 | : Le magnésium dans la mucoviscidose110 | | |
| DISCU | SSION | | | |
| III. | Résul | tats et discussion136 | | |
| IV. | Conc | usion - Perspectives143 | | |
| BIBLIOGRAPHIE | | | | |
| ANNEXES | | | | |

Liste des abréviations

| 4-PBA | sodium phénylbutyrate |
|-----------|--|
| AA | Acide aminé |
| ABC | ATP-Binding Cassette |
| AEBSF | fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyle |
| AHA1 | Activator of HSP90 ATPase homologue |
| ATF | Activating Transcription Factor |
| AMP | Adénosine Monophosphate |
| ATP | Adénosine Triphosphate |
| BiP/GRP78 | Binding immunoglobulin Protein/Glucose-Related Protein 78kDa |
| CF | Cystic Fibrosis |
| CFBE | Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial |
| CFTR | Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator |
| CHIP | C-terminus of Hsc70-Interacting Protein |
| СНОР | CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein |
| COPII | Coatomer Protein II |
| CNX | Calnéxine |
| CREB | Cyclic-AMP-Responsive-Element-Binding protein |
| CRT | Calréticuline |
| EDEM | ER Degradation Enhancing & Mannosidase like protein |
| eIF2 | eucaryotic translation Initiation Factor-2 |
| ENaC | Enithelium Na ⁺ Channel |
| ENaC | Endonlasmia Patiaulum |
| | Endoplashine Reliculum |
| | ER-Associated Degradation |
| ERCIC | ER-resident DNAJ protein |
| ENGIC | En/Golgi interineutate Compartiment |
| ERU | Espèce Reactive de l'Oxygene |
| EKSE | EK-stress Response Element |
| FKBP8 | FK506 Binding Protein 8 |
| GIC | |
| GICNAC | 2 N-acetylglucosamines |
| GRP94 | Glucose-Related Protein 94kDa |
| GIP | Guanosine Tripnosphate |
| Haj | Human Dhaj homolog |
| HRD | HMG-CoA reductase degradation |
| HSC | Heat Shock Cognate |
| HSP | Heat Shock Proteins |
| IKEI | Inositol-Requiring Enzyme |
| JNK | c-Jun N-terminal Kinase |
| Man | Mannose |
| MSD | Membrane Spanning Domain |
| NBD | Nucleotide Binding Domain |
| NEF | Nucleotide-Exchange Factor |
| 089 | Osteosarcoma 9 |
| PERK | PKR-like ER Kinase |
| PGES 3 | Prostaglandin E Synthase 3 |
| РКА | Protein Kinase A |
| РКС | Protein Kinase C |
| PKR | Protein Kinase RNA |
| PDI | Protein Disulfide-Isomerase |
| RE | Réticulum Endoplasmique |
| S1P | Site-1-Protease |

| Site-2-Protease |
|--|
| Séquence d'Arrêt de Transfert |
| Substrate Binding Domain |
| Sterol Regulatory Element Binding Protein |
| Signal Recognition Particle |
| Transmembranaire |
| Transmembrane Domain |
| Tumour Necrosis Factor Receptor |
| TNFR-Associated Factor-2 |
| Transient Receptor Potential cation channel, subfamily M, member 7 |
| Ubiquitine C |
| UDP-Glucose : Glycoprotein glucosyltransferase 1 |
| upstream Open Reading Frame |
| Unfolded Protein Response |
| X-box Binding Protein 1 |
| XTP3 transactivated protein |
| |

Table des illustrations

| Figure 1 : Schéma expliquant brièvement la technique de pulse-chase utilisée par Palade |
|---|
| Figure 2 : Schéma explicatif de la translocation co-traductionnelle |
| Figure 3 : Modèle d'insertion d'une protéine de type I dans la membrane du RE |
| Figure 4 : a) Modèle d'insertion d'une protéine de type II dans la membrane du RE6 |
| Figure 5 : Modèle d'insertion d'une protéine à multiples domaines TM dans la membrane du RE7 |
| Figure 6 : Schéma récapitulatif des différentes catégories de chaperonne présentes dans le RE10 |
| Figure 7 : Schéma de la cupule glucidique11 |
| Figure 8 : Modèle de la voie de dégradation des protéines glycosylées mal repliées14 |
| Figure 9 : Comparaison des complexes de rétro-translocation15 |
| Figure 10 : Shéma représentatif des différents inducteurs du stress du RE19 |
| Figure 11 : Schéma récapitulatif du rôle général de l'UPR20 |
| Figure 12 : Schémas représentatifs de la structure de BiP21 |
| Figure 13 : Schéma récapitulant les différentes localisations de BiP |
| Figure 14 : Schéma général de l'UPR25 |
| Figure 15 : Schéma descriptif de la voie IRE1 de l'UPR26 |
| Figure 16 : Schéma descriptif de la voie PERK de l'UPR28 |
| Figure 17 : Schéma montrant l'homologie des voies d'activation des protéines ATF6 et SREBP30 |
| Figure 18 : Schéma récapitulatif des différentes voies de signalisation induites par l'UPR32 |
| Figure 19 : Shéma simplifié de la structure de TRPM736 |
| Figure 20 : Graphique représentatif des différences d'incidence de la mucoviscidose |
| Figure 21 : Prévalence de la mucoviscidose en France40 |
| Figure 22 : Tableau présentant les mutations de la mucoviscidose les plus fréquentes dans la |
| population française en 201541 |
| Figure 23 : Schéma représentatif de la structure du CFTR42 |
| Figure 24 : Modèle théorique de la structure du CFTR-WT43 |
| Figure 25 : Schéma du modèle d'ouverture et de fermeture du canal CFTR44 |
| Figure 26 : Schéma simplifié de la biosynthèse du CFTR45 |
| Figure 27 : Schéma de l'insertion des deux premiers TMs du CFTR dans la membrane du RE46 |
| Figure 28 : Schéma des différentes étapes de l'insertion du CFTR dans la membrane du RE47 |
| Figure 29 : Réseau des protéines chaperons impliquées dans le contrôle et le repliement du CFTR48 |
| Figure 30 : Schéma simplifié de la régulation du volume d'eau du mucus |
| Figure 31 : Exemples de canaux ioniques ou de transports transmembranaires régulés par le CFTR51 |
| Figure 32 : Image de microscopie confocale sur des macrophages humains représentant le CFTR52 |

| Figure 33 : Schématisation des conséquences d'une dysfonction de la protéine CFTR | 55 |
|---|-------|
| Figure 34 : Diagramme représentant l'impact de l'altération de la fonction du CFTR | 56 |
| Figure 35 : Schéma récapitulatif des six classes de mutation | 59 |
| Figure 36 : Tableau récapitulatif des principales molécules correctrices ou potentiatrices du C | FTR61 |

INTRODUCTION

Les protéines ont longtemps été imaginées et visualisées comme une simple succession d'acides aminés (AA) disposés sur un plan linéaire. En 1864, Felix Hoppe-Seyler cristallise l'hémoglobine pour la première fois et émet l'hypothèse que les protéines possèdent en réalité des structures bien plus complexes que ce que les scientifiques de l'époque pouvaient penser. Près d'un siècle plus tard, en 1962, Kendrew et Perutz reçoivent le prix Nobel de chimie pour avoir observé et décrit la structure de la myoglobine de mouton par cristallographie aux rayons X [1]. Ils ont pu observer pour la première fois que les protéines n'étaient pas planes mais qu'elles étaient repliées dans l'espace. Ce repliement est appelé conformation tridimensionnelle 3D, ou structure tertiaire. La conformation 3D d'une protéine n'est pas le fruit du hasard mais est d'une part, intrinsèquement liée à la séquence d'AAs composant la protéine [2] et d'autre part, dépendante de l'environnement dans lequel la protéine évolue [3]. En outre, le repliement 3D d'une protéine est un élément primordial et indissociable de sa fonction [4]. Afin d'éviter la survenue d'erreurs dans le repliement des protéines, la cellule a mis en place des systèmes de contrôle et de correction de la conformation 3D des protéines, cruciaux pour la survie cellulaire. Une conformation 3D alternative peut en effet modifier la fonction d'une protéine et de ce fait, peut être à l'origine de certaines pathologies (protéinopathies) telles que les maladies à prion, la maladie d'Alzheimer, la chorée de Huntington ou la maladie de Parkinson [5-9]. L'organite cellulaire au cœur de ce contexte est le réticulum endoplasmique (RE).

I. Le réticulum endoplasmique

a. Généralités

L'histoire du RE débute en 1944 avec Keith Porter. En effet, cette année-là, celui que l'on surnommait le « Père de la biologie cellulaire » se marie avec la microscopie électronique et collabore notamment avec Albert Claude, expert en fractionnement cellulaire par ultracentrifugation, afin d'observer, pour la première fois de l'histoire, des cellules en microscopie électronique en transmission. De ce ménage à trois naîtront des photographies de cellules grossies et résolues à des niveaux jamais atteints auparavant [10]. Outre le fait d'apporter une multitude de nouvelles informations sur les organites déjà décrits (mitochondries, noyaux, etc.), cette prouesse technologique majeure permet la découverte d'un nouveau composant cytoplasmique. En effet, en observant au microscope électronique des cellules embryonnaires de poulet, ils décrivent « une substance » peu dense délimitée par une membrane dense dentelée à l'aspect granuleux sur sa face externe [11]. Après de multiples

collaborations et observations du nouvel organite, notamment dans des cellules cancéreuses [12-15], Porter décide de nommer ce nouveau composant cellulaire « réticulum endoplasmique ».

Le RE est aujourd'hui décrit comme un organite cellulaire, exclusivement eucaryote, constitué de réseaux de tubules membranaires interconnectés. Il existe deux types de RE, différant par leurs structures et leurs fonctions, et présents dans la quasi-totalité des cellules eucaryotes : un RE lisse et un RE granuleux. Ces deux RE se différencient respectivement par l'absence ou la présence de ribosomes à leur surface. Le RE est la prolongation de la double membrane nucléaire [16].

Sans vouloir en aucun cas dénigrer l'importance des fonctions du RE lisse (détoxification, stockage du calcium, synthèse de lipides [17]), nous ne nous intéresserons dans ce manuscrit qu'au RE granuleux.

Au cours de ces travaux, Porter observe que le RE libère dans le cytosol des sortes de « granules ». Porter est alors loin d'imaginer qu'il vient d'effleurer la fonction majeure du RE: la biosynthèse des protéines.

b. Rôles du réticulum endoplasmique granuleux

a) Biosynthèse protéique

Bien qu'il n'ait pas travaillé seul, c'est Georges Palade qui fournit une première preuve du rôle du RE dans la synthèse des protéines, ce qui lui vaudra le prix Nobel de Médecine en 1974, (Albert Claude et Christian De Duve étant colauréats). Palade démontre ceci en réalisant des expériences de *pulse-chase*, couplées à de l'autoradiographie (leucine tritiée), sur des cellules exocrines de pancréas de cochon d'Inde [18] (Figure 1). Il observe que les leucines radioactives, intégrées dans les protéines néo-synthétisées, sont présentes dans le RE, migrent vers l'appareil de Golgi, puis sont transportées à la membrane via des vésicules afin d'être exocytées [19].



THE CELL, Fourth Edition, Figure 10.2 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Figure 1 : Schéma expliquant brièvement la technique de pulse-chase utilisée par Palade afin de démontrer le rôle du RE dans la biosynthèse des protéines. On y voit, à 3 minutes, la leucine tritiée présente dans les RE. A 7 minute, la leucine tritiée a transité vers l'appareil de Golgi où elle sera transportée dans des vésicules puis exocitée à 120 minute à travers la membrane plasmique. (THE CELL, Fourth Edition)

Grâce aux travaux accomplis ces dernières années on sait aujourd'hui qu'un tiers des protéines néo-synthétisées transitent par le RE [20, 21]. Ce sont majoritairement les protéines membranaires, sécrétées et lysosomales. Brièvement, une fois la transcription et la maturation de l'ARNm effectuées, débute alors la traduction par un ribosome libre dans le cytosol de la cellule. Si le polypeptide codé par l'ARNm doit passer par le RE alors le début de sa séquence d'AA contiendra une séquence située en N-terminal appelée peptide signal. Cette séquence va permettre la liaison du ribosome à la membrane du RE. En effet, un complexe protéique appelée particule de reconnaissance du signal (en anglais *signal recognition particle* (SRP)) se fixe au peptide signal et au ribosome afin de les transporter vers la membrane du RE (Step 1 Figure 2). La SRP se fixe sur son récepteur situé sur la membrane externe du RE, le ribosome se fixe sur un complexe protéique et le signal peptide de la protéine est inséré et fixé dans le pore de translocation appelé Sec61 (Step 2 Figure 2). La protéine peut alors être synthétisée et transloquée dans la lumière du RE au fur et à mesure, c'est ce que l'on appelle la translocation

co-traductionnelle (par opposition à la translocation post-traductionnelle où la protéine est transloquée dans la lumière du RE une fois la traduction dans le cytosol terminée) (Step 3 Figure 2). Une *signal peptidase* coupe ensuite la partie correspondante au signal peptide et la synthèse protéique se poursuit jusqu'à ce que la totalité de la protéine soit dans le RE (Step 4 Figure 2) [22].





Figure 2 : Schéma explicatif de la translocation co-traductionnelle. L'ARNm en cours de traduction par un ribosome libre dans le cytosol est transporté à la membrane du RE grâce à la SRP qui permet la liaison entre le ribosome et le peptide signal. La SRP se fixe à son récepteur situé sur l'extérieur de la membrane du RE puis le peptide signal est inséré dans le pore Sec61, la traduction et la translocation de la protéine se font simultanément. Une signal peptidase située dans la lumière du RE coupe ensuite le peptide signal puis, une fois la traduction de la protéine terminée, cette dernière se replie spontanément. (THE CELL, Fourth Edition)

Le paragraphe ci-dessus donne une brève explication de la translocation co-traductionnelle seulement pour les protéines sécrétées, golgiennes, lysosomales ou du RE. La translocation des protéines transmembranaires (et quelques autres protéines solubles) va nécessiter une étape supplémentaire : l'insertion co-traductionnelle dans la membrane du RE. En effet, les propriétés hydrophobes des domaines transmembranaires impliquent que ces protéines ne doivent pas se retrouver dans un environnement aqueux tel que celui du RE. En outre, il faut savoir que le

mode d'insertion de la protéine dans la membrane du RE dépend de la topologie de la protéine et de la localisation finale des extrémités N-terminale et C-terminale [23].

Le premier cas est celui des protéines possédant une extrémité N-terminale externe et l'extrémité C-terminale cytosolique (protéine de type I). Le pore de translocation est le même que pour les protéines qui ne sont pas insérées dans la membrane du RE, le canal Sec61 [24]. L'initiation de la translocation est également identique, à la seule différence que ces protéines contiennent une séquence d'arrêt de transfert (SAT) qui, comme son nom l'indique, stoppe la translocation. Bien que la translocation soit stoppée, le ribosome à l'extérieur du RE continue la traduction de l'extrémité C-terminale cytosolique. L'intégration dans la membrane du RE se réalise grâce au déplacement latéral de la SAT à travers les sous-unités de Sec61 [25]. La SAT, qui est hydrophobe et α -hélicoïdale, sert de point d'ancrage de la protéine dans la membrane du RE (Figure 3).



Figure 3 : Modèle d'insertion d'une protéine de type I dans la membrane du RE. La protéine (ici l'insuline) est transloquée cotraductionnellement à travers Sec61. La translocation s'arrête lorsqu'une SAT est traduite, cependant la traduction continue dans le cysol. Cette SAT, une fois intégrée dans la membrane du RE, sert de point d'ancrage à l'insuline dans la membrane du RE. (Molecular Cell Biology, 8th edition)

Les protéines de type II sont des protéines dont l'extrémité N-terminale est cytosolique et l'extrémité C-terminale externe. Ici aussi, le mode de translocation est quasiment similaire aux protéines non insérées dans la membrane du RE, à deux différences près. La première différence réside dans le fait qu'il n'y a pas de peptide signal à l'extrémité N-terminale de la protéine, c'est un domaine interne de la protéine. Ainsi, lorsque cette séquence est reconnue par la SRP, la partie N-terminale de la protéine est déjà traduite. Le peptide signal est orienté de manière a

ce que la partie N-terminale déjà traduite ne soit pas transloquée dans la lumière du RE. Puis, ce peptide signal est fixé à l'intérieur du translocon et le reste de la protéine est transloquée dans la lumière du RE au fur et à mesure de sa traduction. La partie C-terminale se retrouve ainsi dans la lumière du RE. La seconde différence réside dans le fait que, contrairement aux protéines non insérées et aux protéines de type I, le peptide signal ne va pas être clivé mais au contraire devient une hélice α et sert de point d'ancrage à la protéine dans la membrane (Figure 4).

Il existe également les protéines membranaires de type III. L'insertion co-traductionnelle est la même que celle des protéines du type II mais l'orientation de la protéine dans la membrane du RE est opposée. Pour cela, le peptide signal est orienté de manière à insérer la partie N-terminale dans la lumière du RE. Enfin, le ribosome termine la traduction de l'extrémité C-terminale de la protéine dans le cytosol.



Figure 4 : a) Modèle d'insertion d'une protéine de type II dans la membrane du RE. La partie N-terminale de la protéine (ici une asialoglycoprotéine) ne contient pas de peptide signal et est traduite dans le cytosol. Lorsque le peptide signal interne est traduit il est reconnu par la SRP. Le peptide signal, orienté de manière à ce que l'extrémité N-terminale de soit pas transloquée, est alors fixé dans Sec61. Le reste de la protéine est transloquée co-traductionnellement dans la lumière du RE. Le peptide signal n'est pas clivé et s'enroule en hélice α afin de servir de point d'ancrage de la protéine dans la membrane du RE. b) Modèle d'insertion d'une protéine de type III dans la membrane du RE. Le fonctionnement est le même que pour les protéines de type II mais le peptide signal est orienté de manière à ce que l'extrémité C-terminale de la protéine soit cytosolique. (Molecular Cell Biology, 8th edition)

Le dernier cas est celui des protéines possédant plusieurs domaines transmembranaires (protéine de type IV). Cette insertion co-traductionnelle va être possible en utilisant les trois cas précédemment expliqués. Il y a d'abord traduction de l'extrémité N-terminale puis

reconnaissance du peptide signal interne. Le peptide signal, servant d'ancrage à la membrane et fixé au translocon, correspond au premier domaine transmembranaire de la protéine. L'extrémité C-terminale continue d'être traduite et transloquée jusqu'à ce qu'une SAT soit traduite. Cette SAT correspond au second domaine transmembranaire de la protéine. Il y a alors intégration dans la membrane du RE des deux domaines transmembranaires par ouverture latérale du translocon Sec61. S'en suit alors une alternance de peptide signal et de SAT dans la composition de la protéine, qui formeront les différents domaines transmembranaires de la protéine (Figure 5). Une protéine ayant les extrémités N-terminale et C-terminale dans le cytosol appartient au type IV-A. Les protéines de type IV-B ont l'extrémité N-terminale externe et l'extrémité C-terminale cytosolique.



Figure 5 : Modèle d'insertion d'une protéine à multiples domaines TM (protéine de type IV) dans la membrane du RE. L'extrémité N-terminale de la protéine (ici le transporteur de glucose GLUT1) est traduite dans le cytosol puis un premier peptide signal interne est reconnu par la SRP. La protéine est orientée de manière à ce que son extrémité N-terminale soit cytosolique. Le peptide signalest fixé à Sec61 et la protéine est transloquée dans la lumière du RE. Lorsqu'une SAT est traduite il y a arrêt de la translocaton. Le peptide signal et la SAT se déplacent latéralement afin de former les deux premiers domaines transmembranaires de la protéine, puis la translocation reprend avec un nouveau peptide signal. L'alternance de peptide signal et SAT formeront les domaines transmembranaires de la protéine. (Molecular Cell Biology, 4th edition)

La prochaine étape de maturation des protéines s'effectue dans la lumière du RE. Cet environnement, présentant une très forte concentration en protéines (de l'ordre de 100 à 400 mg/mL) [26, 27], est oxydant et optimisé notamment pour le repliement et l'assemblage des protéines [28].

b) Repliement des protéines

Tout d'abord, il est nécessaire de préciser que ce paragraphe n'a pas pour but de décrire les différents phénomènes de repliement protéique, ces derniers étant nombreux, complexes (pas encore totalement compris) et régis par des lois appartenant aux domaines de la physique et de la thermodynamique. Brièvement, lors de son entrée dans la lumière du RE, la protéine est sous une forme non repliée, instable, et ne possède pas de structure tertiaire. C'est dans la lumière du RE que la protéine va pouvoir se replier (forme native, stable) de manière correcte afin de devenir une unité fonctionnelle au sein de la cellule [26, 29]. Le repliement des protéines est un processus nécessitant précision mais également rapidité (le repliement des protéines s'effectue en moyenne en quelques microsecondes [30]). En effet, comme dit précédemment, la conformation de la protéine est la composante majeure de sa fonction et aucune erreur de conformation ne doit être commise. Le repliement doit être rapide dans le sens où sous leur forme non repliée, les chaînes polypeptidiques externalisent des résidus hydrophobes, favorisant l'agrégation des protéines entre elles et empêchant ainsi leur repliement.

Dans un environnement donné, la protéine va se replier spontanément. L'élément clé de ce repliement est la succession d'AAs composant la protéine [2]. Les différentes propriétés physico-chimiques de chaque AA (charge, hydrophobicité, volume, etc.) vont en effet générer une structure tertiaire de la protéine de manière spontanée dans un environnement précis. Pour certaines protéines (généralement les plus petites) ce repliement spontané permet à la protéine d'être totalement fonctionnelle. En revanche, pour d'autres, ce repliement ne permet pas la fonctionnalité de la protéine, il y a alors intervention de protéines chaperonnes, permettant la finalisation du repliement. Les chaperons moléculaires vont également prendre en charge les protéines dénaturées.

c) Protéines chaperonnes et contrôle qualité

Le terme « chaperon » utilisé pour désigner la fonction de ces protéines n'est en rien une référence au célèbre conte de Charles Perrault mais, de manière tout aussi séduisante, il prend en réalité ses racines dans la pièce de cuir utilisée en fauconnerie et que l'on fait porter aux rapaces afin de couvrir leurs yeux pour qu'ils restent calmes. Ce terme a par la suite désigné la personne qui était autrefois chargée de surveiller un jeune couple non marié dans ses déplacements afin qu'il n'y ait pas de « dérives ». Et c'est bien là le rôle d'une protéine chaperonne : surveiller et éviter l'apparition de défauts éventuels pouvant survenir dans le fonctionnement ou la structure des protéines cellulaires. Ce terme fut inventé par Laskey *et al.* en même temps qu'ils mirent en évidence pour la première fois la fonction de chaperon moléculaire en 1978 [31], une des dernières fonctions protéiques découvertes [32]. Il existe différents types de protéines chaperonnes ayant des rôles et des structures très différentes mais elles ont toutes en commun la capacité de fixer des résidus hydrophobes d'autres protéines.

Les protéines chaperonnes sont surexprimées en cas de stress (thermique, oxydatif, chimique, etc.) pouvant modifier la structure 3D des protéines. En effet, les protéines étant très sensibles aux changements environnementaux [33], en cas de stress, elles se dénaturent facilement, perdent leur fonction et s'agrègent en raison de l'externalisation de leurs résidus hydrophobes, mettant en péril la survie cellulaire. Il y a alors production des chaperonnes qui vont participer à la solubilisation des agrégats protéiques [34-37], au maintien et à la réparation de la structure des protéines dénaturées, afin que même en situation de stress, les protéines puissent exécuter leurs fonctions. Les premières chaperonnes exprimées à la suite d'un stress ont été historiquement appelées *heat shock protein* (HSP) lorsqu'elles ont été découvertes dans des cellules de drosophile soumises par erreur à un stress thermique [38].

Lorsqu'il n'y pas de situation de stress, les chaperonnes interviennent dans l'aide au repliement des protéines nouvellement synthétisées [39], la formation des ponts disulfures, l'assemblage d'oligomères [40] ou la dégradation protéique [41]. Bien qu'il existe un nombre important de protéines chaperonnes résidentes de la lumière du RE, les plus connues sont *Binding immunoglobulin Protein/Glucose-Related Protein 78kDa* BiP/GRP78, *Glucose-Related Protein 94kDa* (GRP94), la calréticuline (CRT), la calnéxine (CNX) et la famille des *protein disulfide-isomerase* (PDI).

La première catégorie de chaperonnes sont celles qui vont intervenir dans le repliement des protéines, les plus abondantes étant BiP et GRP94. Il existe différentes situations qui peuvent nécessiter ou non la prise en charge d'une protéine par ce type de chaperonnes. Dans un premier cas, la protéine est assez courte et se replie rapidement une fois sa translocation dans la lumière du RE terminée. Soit la protéine est bien repliée, soit elle ne l'est pas. Dans cette dernière situation, il y a alors prise en charge de la protéine par une chaperonne qui va l'aider à se replier. Dans un second cas, concernant cette fois-ci les protéines plus longues, il y a prise en charge du peptide naissant avant la fin de sa translocation. En effet, tandis que la partie Cterminale n'est pas encore synthétisée, la partie N-terminale peut extérioriser des résidus hydrophobes (normalement intériorisés par le reste de la protéine). En attendant la fin de la synthèse permettant le repliement complet de la protéine (et donc l'intériorisation des résidus hydrophobes) une chaperonne peut venir se fixer aux résidus hydrophobes et les cacher afin d'éviter une agrégation possible avec d'autres protéines [42] (Figure 6.b). Les différentes chaperonnes peuvent agir seules, de concert ou former des complexes avec d'autres protéines chaperonnes [43].

Une seconde catégorie de chaperonnes ayant un rôle crucial dans le repliement des protéines sont les protéines appartenant à la famille des PDI. Ces protéines sont en effet chargées de la formation des ponts disulfures entre deux cystéines d'une protéine, nécessaires à la stabilité de la structure tertiaire, l'association des sous-unités protéiques ou bien la fonction de la protéine [44]. Les ponts disulfures ne peuvent être créés que dans le RE qui possède un environnement assez oxydant. Certains ponts sont définitifs et d'autres temporaires (servant à la formation des ponts définitifs). Très brièvement, durant la translocation du peptide dans le RE, des PDI catalysent l'oxydation de deux cystéines proches, puis plusieurs autres protéines (*ER oxireductin 1, glutathione peroxydase 7/8*) permettent l'oxydation des PDI afin qu'elles conservent leur potentiel oxydatif pour la formation des ponts disulfures suivants (Figure 6.c).



Figure 6 : Schéma récapitulatif des différentes catégories de chaperonnes présentes dans le RE. Les chaperonnes BiP et GRP94 prennent en charge le peptide naissant pour aider à son repliement, tandis que les PDI catalysent la formation de ponts disulfures. Une fois glycosylées, les protéines sont repliées par le couple CRT/CNX. Agissant de concert avec UGGT, les protéines bien repliées sont exportées vers l'appareil de Golgi tandis que celles mal repliées sont prises en charge par EDEM et dégradées par le protéasome. (D'après McCaffrey et Braakman, 2016)

Une dernière catégorie de protéines chaperons présentes dans le RE, les lectines CNX (ancrée à la membrane du RE) et CRT (soluble), interviennent quant à elles dans le repliement

des protéines glycosylées. En effet, la majorité des protéines sécrétées sont glycosylées dans lumière du RE. La N-glycosylation est une modification co/post-traductionnelle qui consiste dans un premier temps à l'ajout co-traductionnel par l'oligosaccharyltransférase d'un oligosaccharide sur une asparagine appartenant à une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X représente tous les AAs sauf la proline) présente dans le peptide naissant. Cette cupule glucidique est composée de 3 glucoses, 9 mannoses et 2 N-acetylglucosamines (Glc₃-Man₉-GlcNAc₂). Les glucoses N et M sont rapidement clivés respectivement par les glucosidases I et II [45, 46] (Figure 7).



Figure 7 : Schéma de la cupule glucidique transférée en bloc sur une asparagine d'un peptide naissant au cours de sa translocation dans la lumière du RE pendant le processus de N-glycosylation. L'oligosaccharide est composé de 2 N-acétylglucosamine (carrés bleus), 9 mannoses (ronds verts) et 3 glucoses (triangles rouges), répartis sur 3 chaînes A, B et C. (Ferris et al., 2014)

Une fois ce clivage réalisé, la CNX et la CRT vont pouvoir interagir avec la protéine glycosylée grâce à la reconnaissance de la chaîne monoglucosylée Glc₁-Man₉-GlcNAc₂ et aider la protéine à se replier. Agissant en synergie avec le couple CNX/CRT, ERp57 (une PDI) par exemple, créé des ponts disulfures sur la protéine en cours de repliement par les lectines [47]. La glucosidase II clive ensuite le dernier glucose (L) présent de la chaîne, ce qui entraîne la séparation de la CRT et CNX avec la glycoprotéine en cours de repliement. Si cette protéine

est parfaitement repliée, l'ER α 1,2-mannosidase I clive le mannose I de la chaîne B, puis la protéine est exportée vers l'appareil de Golgi via *ER/Golgi intermediate compartiment* (ERGIC) et les vésicules *coatomer protein II* (COPII) pour terminer sa maturation (Figure 6.e). Dans le cas contraire, la protéine est reconnue par *UDP-Glucose : Glycoprotein glucosyltransferase 1* (UGT1, également abrégé UGGT). La particularité de cet enzyme est de reconnaître à la fois les résidus hydrophobes (caractéristiques des protéines partiellement repliées) et la chaîne Man₉-GlcNAc₂ (c'est à dire sans le dernier glucose L). Un glucose est ajouté aux chaînes des protéines mal repliées et elles sont donc reprises en charge par la CNX et CRT afin d'augmenter les capacités de repliement des protéines (Figure 6.d). Ce cycle se répète durant un certain temps jusqu'à ce que l'ER α 1,2-mannosidase I [48] et possiblement l'*ER-degradation enhancing* α -mannosidase-like protein (EDEM) 2 [49] viennent cliver le mannose I de la chaîne B. L'oligosaccharide, à présent Man₈-GlcNAc₂, n'est reconnu ni par le couple CNX/CRT ni par l'UGT1, ce qui dirige la protéine glycosylée mal repliée vers le système *ER-associated degradation* (ERAD) afin d'être dégradée par le protéasome [50] (Figure 6.f).

d) Le système ERAD

Bien que les recherches des 20 dernières années aient permis une remarquable avancée dans la compréhension de ce système de dégradation, cela ne permet pas aujourd'hui d'appréhender complètement son fonctionnement. La littérature présente toutefois la dégradation des protéines via le système ERAD comme nécessitant trois étapes : la reconnaissance des protéines à dégrader, la rétro-translocation de ces protéines de la lumière du RE vers le cytosol et enfin la dégradation ubiquitine-dépendante par le protéasome 26S.

(1) Cas des protéines glycosylées

Concernant les protéines glycosylées, cette reconnaissance se réalise grâce au clivage de mannose spécifique composant la cupule glucidique, agissant comme une sorte de « glycocode » [50]. Par exemple, à la suite du clivage du mannose I de la chaîne B par l'ER α 1,2mannosidase I, la protéine glycosylée entre dans la voie de dégradation ERAD. Par la suite, le mannose K de la chaîne C est clivée par l'EDEM 1 [51] et l'EDEM 3 [52]. Ce dernier clivage permet l'interaction entre la protéine glycosylée et les protéines osteosarcoma 9 (OS9) et XTP3 transactivated protein (XTP3-B) [53, 54]. Ces deux protéines sont capables de se lier aux chaînes glucidiques de type Man₅₋₈-GlcNAc₂ et à Sel1L, une protéine appartenant au complexe de rétro-translocation [55]. OS9 et XTP3-B vont ainsi transporter la protéine à dégrader vers le pore de rétro-translocation par l'intermédiaire de SEL1L [56]. De la même manière que pour le repliement des protéines, les chaperons vont également agir en synergie. Ainsi, pendant le transport des protéines glycosylées vers le complexe, des chaperons tels que BiP , GRP94 [57] ou des PDI (ERdj5 par exemple) [58] vont déplier la protéine, facilitant ainsi son passage à travers le complexe de rétro-translocation. Une autre protéine présente dans ce complexe de rétro-translocation est *HMG-CoA reductase degradation* (HRD) 1, une ubiquitine ligase E3, associée à Derlin-2/3 [59]. SEL1L et HRD1 interagissent ensemble et régulent le passage des protéines du RE vers le cytosol [60, 61]. Avant et pendant cette rétro-translocation, les protéines mal formées sont ubiquitinylées, ces dernières sont reconnues par le protéasome 26S dans le cytosol puis dégradées (Figure 8).



Figure 8 : Modèle de la voie de dégradation des protéines glycosylées mal repliées. Une fois les protéines transloquées et Nglycosylées, la glucosidase I et II (GI et GII) clivent les deux premiers glucoses de la cupule glucidique. La protéine est repliée par le couple CRT/CNX et de nouveau clivée par la GII (clivage du dernier glucose). Si le repliement est bon, le dernier mannose de la chaîne B est clivé par l'ERManI et la protéine est sécrétée. Dans le cas d'un mauvais repliement, la protéine rentre dans le cycle de repliement entre le couple CRT/CNX et l'UGGT (cf partie précédente). L'ERManI met fin à ce cycle et la protéine est prise en charge par les protéines EDEM puis OS-9 et XTP3-B avant d'être rétro-transloquée par le complexe HRD. Les ronds verts représentent les protéines homologues chez S. cerevisiae. (D'après Xu et Ng, 2015)

Comme dit précédemment, ce modèle actuel n'est valable que pour les protéines glycosylées (la majorité des protéines synthétisées dans le RE), mais qu'en est-il des protéines non glycosylées ?

(2) Cas des protéines non glycosylées

Les mécanismes de reconnaissance par le système ERAD des protéines non glycosylées destinées à la dégradation sont encore mal compris. La littérature rapporte cependant que deux protéines ont un rôle central dans la reconnaissance des protéines non glycosylées : BiP [63] et ERdj5 [64]. Concernant le transport des protéines non glycosylées jusqu'au complexe de rétrotranslocation, deux écoles s'affrontent. Certains auteurs pensent que ces voies sont bien distinctes entre les protéines glycosylées et non glycosylées [65]. Le complexe de translocation serait également différent, faisant ainsi intervenir HERP et Derlin-1 à la place de SEL1L et Derlin-2/3 (Figure 9) [64]. Dans ce cas, ce serait principalement BiP et ERdj5 qui seraient en charge du transport et de l'interaction des protéines avec le complexe [66].

D'autres auteurs pensent en revanche que des protéines telles que EDEM1 pourraient également prendre en charge des protéines non glycosylées et les faire interagir avec le complexe HRD1/SEL1L, similairement aux protéines glycosylées [67].



Figure 9 : Comparaison des complexes de rétro-translocation pour les protéines glycosylées (à gauche) et non glycosylées (à droite). Les protéines glycosylées sont prises en charge par les protéines EDEM et le couple OS-9/XTP3-B, dépliées simultanément par BiP et ERdj5, puis rétro-transloquées par HRD1 associé à SEL1L et Derlin-2/3. Les protéines non glycosylées sont prises en charge et dépliées par BiP et ERdj5 puis rétro-transloquées par HRD1 associé à SEL1L et Derlin-2/3. Les protéines non glycosylées (à Gauche) et Derlin-1. (D'après Ushioda et Nagata, 2011)

Les auteurs en faveur d'un modèle à deux voies distinctes émettent l'hypothèse d'une possible interchangeabilité des voies. En effet, ils ont montré que sous certaines conditions de stress du RE (stress oxydatif et accumulation de protéines dans la lumière du RE) des protéines glycosylées, normalement sous contrôle des EDEMs, sont prise en charge par la voie BiP/ERdj5. Ninagawa et coll. vont plus loin en soupçonnant l'existence d'une protéine (protéine X) qui aiguillerait les protéines glycosylées vers la voie de dégradation des protéines non glycosylées [65].

En résumé, le système ERAD laisse encore plusieurs questions en suspens. Par exemple : Sec61 est-il impliqué dans la rétro-translocation des protéines ? [68]. Une autre question que nous sommes en droit de nous poser est : quel(s) élément(s) détermine(nt) l'entrée dans la voie de dégradation d'une protéine ? En effet, lorsqu'une protéine glycosylée est retenue dans le RE et alterne entre le couple CRT/CNX et l'UGT1, comment est déterminé le temps de rétention de la protéine dans le RE avant que ER α 1,2-mannosidase I dirige la protéine vers l'ERAD ? Ces questions laissent à penser que les mécanismes régissant le système ERAD sont loin d'être totalement compris.

Il est cependant bien admis que le l'ERAD est lié de très près à un autre système de protection cellulaire : l'*Unfolded Protein Response* (UPR).

II. L'Unfolded Protein Response

a. Généralités

L'UPR (ou réponse aux protéines malformées en français) peut être définie selon Mori comme une réponse adaptative induite lors d'un stress du RE et ayant pour but de maintenir/rétablir l'homéostasie du RE [69].

a) Découverte

Cette réponse aux protéines malformées a été mise en évidence en 1988 par M-J. Gething et J. Sambrook lorsqu'ils étudiaient les *glucose-related proteins* (GRP), et plus particulièrement GRP78 et GRP94 [70].

Ces deux protéines ont été découvertes dans les années 1970. A la suite d'une infection de fibroblastes d'embryons de poulets par le virus du sarcome de Rous, deux équipes ont pu observer une augmentation de l'expression de ces deux protéines [71, 72]. Ils en ont logiquement déduit que l'expression de ces deux protéines (nommées à ce moment-là 75000 daltons et 90000 daltons) était induite par le virus. En réalité, l'induction de ces protéines était due au milieu de culture dans lequel était réalisée l'infection, un milieu dépourvu de glucose. Cela fut prouvé plus tard que ce n'était pas le virus mais bien le manque de glucose qui induisait l'expression de ces deux protéines, renommées alors GRP78 et GRP95 (qui deviendra ensuite GRP94) [73]. Neuf ans plus tard, GRP78 a été identifiée comme étant la même protéine que BiP [74]. BiP avait été décrite quelques années auparavant comme une protéine liée aux chaines lourdes des anticorps des lymphocytes pré-B, d'où son appellation, *binding immunoglobulin protein* [75]. Dans ce manuscrit cette protéine sera par la suite exclusivement nommée BiP.

Pour en revenir à BiP et GRP94, il a par la suite été montré que ces deux protéines étaient inductibles par l'hypoxie, l'exposition à des pH extracellulaires bas ou par l'effet d'un traitement à la tunicamycine ou aux ionophores calciques [76]. A cette époque, la tendance était plutôt à penser que BiP et GRP94 étaient surexprimées lorsque la glycosylation des protéines du RE était altérée. Le coup de génie de Gething et Sambrook a été de prouver expérimentalement que l'induction de BiP et GRP94 n'avait pas pour origine spécialement une altération de la glycosylation mais était due à l'accumulation dans le RE de protéines mal repliées [70]. Afin de simplifier l'étude et la compréhension du nouveau mécanisme cellulaire qu'ils venaient de mettre à jour, les auteurs ont tout d'abord travaillé sur un modèle mammifère
beaucoup plus simple, celui de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), s'assurant à l'avance de la présence d'un homologue de BiP chez cet organisme [77]. C'est ainsi que l'UPR fit ses premiers pas en entrant dans le vaste domaine de la biologie cellulaire.

b) Inducteurs de l'UPR

Un peu moins de 30 ans se sont écoulés depuis la découverte de l'UPR et nous savons aujourd'hui que ce mécanisme cellulaire est crucial pour la survie de la cellule. Nous connaissons également certaines causes de l'induction de l'UPR. Parmi les inducteurs nous pouvons citer la privation de glucose, l'hypoxie (qui entraîne une déplétion en ATP), les changements de l'environnement du RE (espèces réactives de l'oxygène (ERO), une perturbation de l'homéostasie calcique et de l'état d'oxydo-réduction), une demande accrue en protéines, l'altération des systèmes de dégradation protéique, l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, certains virus, etc [78-81] (Figure 10). Toutes ces modifications entraînent un état de stress du RE nécessitant le déclenchement de l'UPR afin de lutter contre ce stress. Comme nous pouvons le constater, l'UPR est fortement liée à la notion de stress du RE bien que de récentes études tendent à montrer qu'il peut y avoir déclenchement de l'UPR ou de certains composants de l'UPR sans pour autant que le RE soit en condition de stress [82].



Figure 10 : Shéma représentatif des différents inducteurs du stress du RE conduisant au déclenchement de l'UPR. (Foufelle et Ferré, 2007)

b. Rôle général de l'UPR

L'UPR est déclenchée dans le but principal de rétablir l'homéostasie du RE. Pour cela, trois stratégies sont mises en place (Figure 11). La première consiste à inhiber la synthèse protéique afin d'empêcher l'accumulation supplémentaire de protéines mal repliées dans le RE pour ne pas aggraver la situation déjà critique. En parallèle, l'UPR active la production de protéines chaperons dans le RE afin d'augmenter les capacités de repliement protéique et de désengorger la lumière du RE. Dans le même but de désengorgement de la lumière du RE, la troisième stratégie consiste à augmenter les capacités de dégradation des protéines malformées via le système ERAD. Enfin, si ces trois stratégies n'ont pas permis de rétablir l'homéostasie du RE, l'UPR déclenche l'apoptose [83, 84]. Quatre protéines vont être au cœur de la mise en place du système UPR : BiP, *Protein Kinase RNA* (PKR)-*like ER Kinase* (PERK), *Inositol-Requiring Enzyme 1*(IRE1) et *Activating Transcription Factor* (ATF) 6.



Figure 11 : Schéma récapitulatif du rôle général de l'UPR. En situation de stress du RE, l'UPR est déclenchée et les trois stratégies de cette réponse consistent à diminuer la traduction générale au sein de la cellule, augmenter les capacités de repliement des chaperons et promouvoir la dégradation des protéines mal repliées retenues dans le RE. Si l'homéostasie du RE n'est pas rétablie, l'UPR déclenche la mort cellulaire programmée de la cellule. (D'après Walter et Ron, 2011)

c. Les différents effecteurs de l'UPR

a) BiP

BiP est codée par le gène *HSPA5* (retrouvé dans tout l'empire eucaryote [85]) et appartient à la famille protéique des HSP70 [74]. A la différence des autres HSP70, BiP possède un peptide signal lui permettant sa translocation dans le RE et un domaine KDEL lui permettant de rester dans la lumière du RE et de pas être sécrétée ou exportée vers un autre compartiment cellulaire [86].

Le rôle principal de BiP est celui de chaperon moléculaire. Cette fonction est rendue possible grâce à sa structure 3D permettant la fixation de BiP aux protéines naissantes, mal repliées ou dénaturées ; de manière générale aux protéines extériorisant des résidus hydrophobes. Pour cela, BiP est constituée, comme toutes les HSP70, de deux domaines majeurs : un domaine de fixation au nucléotide (*Nucleotide Binding Domain* (NBD)) en N-terminal et un domaine de fixation du substrat (*Substrate Binding Domain* (SBD)) en C-terminal (Figure 12) [87, 88].



Figure 12 : Schémas représentatifs de la structure de BiP. Schéma du haut : structure primaire de BiP où sont représentés quatre domaines majeurs : le peptide signal, le NBD, le SBD et le domaine KDEL (de gauche à droite). Schéma du bas : structure 3D des deux domaines principaux de BiP, à gauche le NBD et à droite le SBD. (D'après Wang et al., 2017)

Le NBD est le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP en ADP. L'interaction de BiP avec une protéine est en effet ATP-dépendante et basée sur un cycle allostérique. Lorsque l'ADP est fixée sur le NBD (conformation ADP-liée/fermée), le SBD est conformé de manière à être très affin pour le substrat. A l'inverse, lorsque BiP est dans une conformation ATPliée/ouverte, la structure de SBD est modifiée et son affinité pour le substrat est diminuée, permettant la libération du substrat. La fixation d'un nouveau substrat entraînera l'hydrolyse de l'ATP en ADP et ainsi de suite [89].

Ce mode de fonctionnement nécessite l'intervention de co-chaperons tels que les *ER-resident DNAJ protein* (ERdjs). Ces protéines, également appelées HSP40, se lient aux protéines mal

repliées et permettent la prise en charge de ces dernières par BiP [90, 91]. Outre le recrutement de BiP, les Erdjs ont un second rôle fondamental, celui de catalyser l'hydrolyse de l'ATP liée au NBD de BiP. En effet, l'activité ATPase de BiP étant peu efficace, les ERdjs sont cruciales pour hydrolyser l'ATP permettant la fonction de BiP [92, 93].

Une seconde catégorie de co-chaperons, les *nucleotide-exchange factor* (NEF), sont essentiels à la fonction de BiP. Ce sont en effet ces protéines qui vont permettre le rechargement de BiP en ATP, les deux principaux NEFs de BiP étant GRP170 et Sil1 [94, 95]. Ces deux protéines vont se lier à BiP (état ADP-liée) et déstabiliser le NDB, ce qui va entraîner la libération de l'ADP afin de permettre une nouvelle fixation d'ATP sur BiP [96, 97].

Les expériences de mutations dirigées (articles cités ci-dessus) réalisées sur ces différents cochaperons montrent qu'ils sont indispensables aux multiples fonctions de BiP.

(1) Fonctions de BiP dans le RE

Grâce à cette capacité à fixer les protéines extériorisant des résidus hydrophobes, BiP est au cœur du contrôle du repliement des protéines entrant dans le RE. BiP est retrouvée impliquée dans de multiples fonctions du RE.

En effet, des études réalisées sur la levure *S. cerevisiae* et sur des HEK-293TT ont montré que l'inhibition de BiP (grâce à un promoteur répressif ou par modulation des co-facteurs de BiP) empêche la sécrétion de certaines protéines transloquées post-traductionnellement (facteur α , invertase, sous-unité du virus de l'hépatite B) [98, 99]. Ces études montrent que BiP intervient dans la translocation de ces protéines. Brièvement, deux modèles s'affrontent. Le modèle du cliquet (« *ratchet model* ») où BiP empêcherait le retour de la protéine vers le cytosol et le modèle où BiP tirerait la protéine vers la lumière du RE (« *power stroke model* ») [100, 101]. Ces deux modèles s'accordent sur le fait que BiP agit de manière active, c'est à dire en consommant de l'ATP. Il a de plus été montré que BiP empêche les fuites d'ions tels que le calcium (Ca²⁺) du RE vers le cytosol en perméabilisant le pore Sec61 avant et au début de la translocation des protéines [102, 103]. BiP est impliquée d'une autre façon dans la régulation calcique en chélatant 25 % des ions Ca²⁺ grâce à son domaine NBD [104].

Comme nous l'avons vu précédemment (Partie I.a.c) et I.a.d)), BiP est une protéine centrale du contrôle-qualité des protéines résidentes du RE ou transitant par ce compartiment, en facilitant le repliement ou l'assemblage de ces protéines. BiP permet également d'empêcher l'agrégation des protéines mal repliées, ou si tel est le cas, de solubiliser les agrégats protéiques. Enfin, une autre fonction de BiP est la prise en charge par le système ERAD des protéines mal repliées.

(2) Autres localisations de BiP

En tant que protéine résidente du RE, BiP est au cœur de ce projet de thèse. Il est cependant important de noter que cette protéine est également présente dans d'autres compartiments cellulaires. La séquence primaire de BiP comporte un domaine KDEL en C-terminal, domaine empêchant la protéine d'être sécrétée du RE, cependant la localisation de BiP n'est en effet pas limitée à la lumière du RE.

Ainsi BiP a été retrouvée dans le noyau cellulaire (protection contre les dommages à l'ADN liés à l'apoptose), les mitochondries (régulateur de la balance énergétique durant le stress du RE) [105], le cytosol [106], le milieu extracellulaire et la surface des cellules (récepteur et transducteur de signaux impliqués dans la tumorogenèse) [107] (Figure 13). L'implication de BiP dans des pathologies telles que le cancer sera détaillée plus loin dans cette partie II.



Figure 13 : Schéma récapitulant les différentes localisations de BiP associées aux différentes fonctions. Ces localisations sont retrouvées dans des modèles cellulaires et des conditions spécifiques. (D'après Ni et al., 2011)

Il est clairement établi que BiP est impliquée dans une multitude de fonctions cellulaires dans différents compartiments de la cellule. Nous allons maintenant aborder le rôle le plus important de cette protéine : la détection du stress du RE, le déclenchement et la régulation de l'UPR permettant de lutter contre ce stress.

(3) BiP et l'UPR

En absence de stress du RE, BiP est liée aux trois effecteurs/transducteurs de l'UPR : IRE1, PERK et ATF6, trois protéines ancrées dans la membrane du RE et dans un état inactif. En se basant sur cette observation, il est depuis longtemps admis que la détection et le déclenchement de l'UPR relèvent exclusivement de l'action de BiP. Le modèle est le suivant : lorsqu'une quantité importante de protéines mal repliées est présente dans la lumière du RE, BiP qui a une meilleure affinité pour les protéines mal repliées se dissocie des trois effecteurs, déclenchant ainsi l'UPR [108-110]. Dans ce modèle, BiP agit en tant que capteur du stress du RE et régulateur négatif de l'UPR [111]. Toutefois, de récentes études remettent en question ce modèle. En effet, une équipe japonaise a montré en 2004 qu'en mutant IRE1 chez la levure de manière à abolir la liaison de BiP avec IRE1, l'UPR était quand même induite [112]. Cette étude tend à démontrer que ce ne serait pas BiP le déclencheur primaire de la réponse UPR mais plutôt IRE1. Ce modèle est soutenu par une étude de la structure du domaine luminal d'IRE1, montrant qu'IRE1 serait activé par liaison directe avec les résidus hydrophobes des protéines mal repliées du RE [113]. Ce modèle serait similaire pour PERK. Enfin une troisième étude montre que la dissociation entre BiP et ATF6 n'est pas suffisante pour activer ATF6. Les auteurs ont montré qu'en inhibant la PDI Family A Member 5 (PDIA5) par ARN interférence, l'activation d'ATF6 était également diminuée. ATF6 serait activée par la réduction des cystéines situées dans son domaine luminal et normalement cachées par la liaison BiP/ATF6 [114].

Il n'est pas encore possible de déterminer avec certitude quel modèle est valable ou si les deux modèles peuvent cohabiter, cependant lorsque IRE1, PERK et ATF6 sont activés, ces protéines vont déclencher une série de cascades de signalisation (décrites dans les paragraphes suivants) permettant de rétablir l'homéostasie du RE (Figure 14).



Figure 14 : Schéma général de l'UPR comportant trois branches de signalisation induites par l'activation de PERK, IRE1 et ATF6, ainsi que les effets induits par l'UPR. (D'après Hetz et al., 2015)

Bien que ces trois voies interagissent entre elles, par souci de facilité d'explication chaque voie sera décrite une à une.

b) IRE1

IRE1 est l'effecteur d'une des deux voies transcriptionnelles de l'UPR et le premier effecteur à avoir été découvert à la fois chez la levure S. cerevisiae et chez l'homme. Comme mentionné plus haut, la levure, de par la simplicité de son génome, était le modèle favori pour étudier l'UPR. C'est J.S. Cox et coll. (laboratoire de P. Walter) et K. Mori et coll. (laboratoire de M-J. Gething et J. Sambrook) qui ont montré (par mutagenèse aléatoire et screening) l'implication d'IRE1 dans l'UPR chez la levure, quasi simultanément en 1993 [115, 116]. L'homologue mammifère IRE1 n'a été isolé que 5 ans plus tard par W. Tirasophon et coll. (laboratoire de R. Kaufman) [117]. IRE est l'effecteur de l'UPR le mieux conservé chez les eucaryotes et existe sous deux isoformes, IRE1 α et IRE1 β , respectivement retrouvées dans toutes les cellules et exclusivement dans les cellules épithéliales de l'intestin [118]. IRE1 est une protéine de type I ancrée dans la membrane du RE dont le domaine cytoplasmique comporte une activité kinase et endoribonucléasique. Lors de son activation (par dissociation de BiP et/ou interaction avec les protéines mal repliées) pendant un stress du RE, IRE1 s'oligomérise et se *trans*-autophosphoryle (Figure 15). Le changement conformationnel dû à cette phosphorylation active le domaine endoribonucléasique d'IRE1 [119], entraînant l'épissage de l'ARNm de *X-box binding protein 1* (XBP1). Ce clivage d'un intron de 26 pb change le cadre de lecture et induit la synthèse d'une forme alternative (XBP1s (s pour *spliced*)) de la protéine non clivée (XBP1u (u pour *unspliced*)) [120]. XBP1s, en se liant sur des séquences nucléotidiques *ER-stress response element* (ERSE) dans le noyau, induit la production de protéines impliquées notamment dans la dégradation des protéines via le système ERAD (protéines EDEM1 ou ERdj4 par exemple) [121]. Le but de cette voie IRE1 est entre autres d'augmenter les capacités de dégradation du RE afin de diminuer la quantité de protéines mal repliées dans la lumière du RE et atténuer par conséquent le stress du RE.

En outre, XBP1 induit l'expression d'une autre protéine impliquée dans l'apoptose : *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein* (CHOP) (cette partie sera détaillée plus loin) [122].



Figure 15 : Schéma descriptif de la voie IRE1 de l'UPR. En condition de stress du RE, IRE1 s'oligomérise et se transautophosphoryle afin d'activer son domaine endoribonucléasique, conduisant à l'épissage de l'ARNm de XBP1. La protéine traduite à partir de la forme clivée de l'ARNm, appelée XBP1s, migre vers le noyau et se fixe sur des séquences ERSE induisant la production de protéines notamment impliquées dans le système de dégradation ERAD. La forme non clivée XBP1u produite en fin d'UPR représente un rétrocontrôle qui inhibe l'UPR. (Modifié d'après Ron et Walter, 2006)

Comme beaucoup de systèmes de régulation, l'UPR possède des boucles de rétrocontrôle négatif. Dans la branche IRE1, deux de ces boucles sont activées. La première boucle est réalisée par la forme XBP1u, induite en fin d'UPR, qui agit en tant que répresseur des gènes de l'UPR. De plus, XBP1u peut se complexer à XBP1s. Etant donné que XBP1 est instable, ce complexe est rapidement dégradé par le protéasome, empêchant ainsi XBP1 d'induire des gènes de l'UPR [123]. Un second rétrocontrôle consiste à l'induction, lors de la fixation de XBP1s sur les séquences ERSE, de la production de P58^{IPK}, un inhibiteur de PERK, autre effecteur de l'UPR [121].

c) PERK

Un an après la découverte de l'homologue d'IRE1 chez les mammifères, H. P. Harding et coll. (laboratoire de K. Mori) ont mis en évidence une autre branche de l'UPR chez les mammifères : la voie PERK, ou voie traductionnelle [124] (Figure 16). L'objectif principal de cette voie de l'UPR est d'inhiber fortement et globalement la synthèse protéique dans la cellule afin de ne pas faire entrer davantage de protéines dans la lumière du RE déjà saturée en protéines mal repliées. PERK est une protéine de type I ancrée à la membrane et partage plusieurs similarités structurales avec IRE1, dont le domaine kinase cytosolique. Ainsi, une fois activée, PERK s'oligomérise, se *trans*-autophosphoryle afin de phosphoryler la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eucaryotic translation initiation factor-2 (eIF2). L'effet est quasiimmédiat : la phosphorylation de la sous-unité α d'eIF2 inhibe eIF2B, un facteur d'échange de nucléotides guanyliques qui a pour fonction normale de recharger eIF2 en guanosine triphosphate (GTP). L'initiation de la traduction par la reconnaissance du codon AUG se réalise grâce au complexe eIF2-GTP liée avec un ARN de transfert chargé avec de la méthionine (ARNt^{Met}). Lorsque PERK est activée, eIF2B est inhibé. Par conséquent, la forme GTP-liée de eIF2 est fortement diminuée, conduisant inévitablement à une forte inhibition de la traduction des protéines (nécessitant une reconnaissance d'un AUG pour initier la traduction) dans toute la cellule [125, 126].

Bien que la traduction soit inhibée dans toute la cellule durant les épisodes de stress du RE, l'expression de certains ARNm va être induite par la phosphorylation de la sous-unité α de eIF2. Cette induction transcriptionnelle est rendue possible par la présence de *upstream open reading frame* (uORF) dans la région 5' non codante de certains ARNm. En conditions normales ces uORF inhibent la traduction de l'ORF principal en réinitialisant la traduction à chaque fin de traduction des uORF. A l'inverse, en conditions de stress du RE, lorsqu'eIF2B

est inhibée et que eIF2-GTP liée est rare, les ribosomes ont le temps de scanner l'ORF principal avant d'être rechargés en GTP. Lorsque les ribosomes seront rechargés en GTP ils réinitialiseront la traduction sur l'AUG de l'ORF principal qui sera alors traduit [127]. Parmi les ARNm induits, on retrouve par exemple ATF4 qui, une fois traduit, agit en tant que facteur de transcription et induit l'expression de gènes impliqués dans le transport des AAs ou la résistance au stress oxydatif [128]. ATF4 induit également l'induction de gènes codant la protéine CHOP, impliquée dans l'apoptose [129].

De la même manière, une boucle de rétro-contrôle négatif est induite par l'activation de PERK. Ainsi, growth arrest and DNA-damage- inducible protein-34 (GADD34), une protéine transcriptionnellement co-induite par ATF4 et CHOP [130, 131], entraîne la déphosphorylation de la sous-unité α de eIF2 et met ainsi fin à l'inhibition de la traduction protéique [132]. Une autre protéine, constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation (CReP) qui, comme son nom l'indique est constitutivement exprimée, permet également de déphosphoryler eIF2 afin d'atténuer l'inhibition de la traduction induite par PERK [133].



Figure 16 : Schéma descriptif de la voie PERK de l'UPR. En condition de stress du RE, PERK s'oligomérise et se transautophosphoryle, entraînant la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction elF2. La phosphorylation de elF2 inhibe elF2B, ce qui empêche la formation de la forme GTP-liée d'elF2 essentielle à l'initiation de la traduction des protéines. La phosphorylation de elF2 induit également l'expression de certains ARNm tels que ATF4, entraînant l'expression de gènes impliqués dans le transport des AAs ou la réponse anti-oxydante. GADD34, induite par ATF4 et CHOP, ainsi que CReP, constitutivement exprimée, permettent d'atténuer l'inhibition de la traduction en déphosphorylant la sous-unité α de elF2. (D'après Ron et Walter, 2006)

d) ATF6

ATF6 est de la même manière que BiP au cœur de ce projet de thèse. ATF6 est le dernier transducteur de l'UPR à avoir été découvert.

En 1998, dans le laboratoire de K. Mori, Yoshida et coll. mettent en évidence, par screening de facteurs de transcription se fixant sur les séquences ERSE, l'implication d'ATF6 dans l'UPR et son rôle potentiel en tant qu'effecteur de l'UPR [134]. Ils observent que la transfection d'un plasmide codant ATF6 dans des cellules HeLa entraîne une augmentation des protéines GRP. Un an plus tard, en 1999, K. Haze et coll. parviennent à décrypter presque entièrement la voie de signalisation par laquelle ATF6 transmet le signal de l'UPR jusqu'au noyau cellulaire. L'équipe montre qu'ATF6, appartenant à la famille des ATF-cyclic-AMP-responsive-elementbinding protein (CREB) est une protéine de type II existante sous deux formes, une forme de 90 kDa (ATF6-90 kDa) et une forme de 50 kDa (ATF6-50 kDa). Les auteurs décrivent qu'en conditions normales, ATF6-90 kDa est ancrée dans la membrane du RE et ATF6-50 kDa est inexistante. En conditions de stress du RE, l'expression de ATF6-90 kDa diminue et il y a apparition de ATF6-50 kDa, protéine soluble, dans le noyau cellulaire. Agissant en tant que facteur de transcription, ATF6-50 kDa se fixe sur des séquences ERSE grâce à son domaine bZIP et induit l'expression de gènes codant BiP [135]. Les auteurs montrent également qu'ATF6-50 kDa n'est pas produite directement mais résulte du clivage de la forme ATF6-90 kDa. Les protéines responsables du clivage d'ATF6-90 kDa, site-1-protease (S1P) et site-2protease (S2P) seront découvertes plus tard grâce à l'homologie entre ATF6 et sterol regulatory element binding protein (SREBP), impliqué dans la synthèse des acides gras et du cholestérol [136]. En effet, dans cette étude les auteurs émettent l'hypothèse qu'ATF6 et SREBP empruntent la même voie de signalisation (Figure 17). Ainsi, une fois dissociées de la membrane du RE, ces deux protéines migrent vers l'appareil de Golgi où les deux protéases S1P et S2P opèrent un clivage permettant à la partie cytosolique de migrer vers le noyau afin d'agir en tant que facteur de transcription. Ainsi, en traitant à la tunicamycine (inhibiteur de la N-glycosylation) des lignées cellulaires déficientes en S1P ou S2P, les auteurs n'observent pas ou peu de clivage d'ATF6-90 kDa. Une autre équipe a confirmé cette étude et montré que le clivage doit d'abord être réalisé séquentiellement par S1P puis seulement après par S2P [137]. Il a également été montré que la migration d'ATF6-90 kDa du RE vers l'appareil de Golgi s'effectue via des vésicules COPII [138].

Une fois clivée, la fixation d'ATF6-50 kDa sur les séquences ERSE n'entraînent pas seulement la production de BiP mais également la production de son co-chaperon ERdj3, et des protéines

telles que GRP94 ou des PDI (ERO1 par exemple) [139]. ATF6-50 kDa induit également l'expression des gènes de P58^{IPK} et XBP1 dont l'ARNm est par la suite épissé par IRE1 [140]. Le but de l'induction de ces protéines en particulier est d'augmenter les capacités du RE à replier les protéines afin de diminuer la charge de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Grâce à des analyses par puces à ADN, Okada et coll. ont également montré en 2002 que ATF6 induit l'expression de CHOP, impliquant cette branche de l'UPR dans l'induction de la mort cellulaire [141].



Figure 17 : Schéma montrant l'homologie des voies d'activation des protéines ATF6 et SREBP. Les deux protéines sont maintenues inactives dans la membrane du RE puis, une fois dissociées de cette membrane, migrent vers le Golgi où S1P et S2P opèrent un clivage. Une fois la partie cytosolique N-terminale libérée, cette dernière migre vers le noyau et se fixe sur des séquences spécifiques. (D'après Kaufman et al., 2002)

Dans le paragraphe ci-dessus, le terme ATF6 regroupe les deux isoformes : ATF6 α et ATF6 β . Ces deux isoformes suivent exactement les mêmes voies d'activation mais diffèrent par les effets induits et leurs devenirs dans la cellule (cette différence est due à une séquence en AA différente dans le domaine N-terminal). Ainsi, ATF6 α est capable d'induire fortement l'expression de certains gènes lors de sa fixation sur les séquences ERSE et sera par la suite rapidement dégradée. Au contraire, le pouvoir transcriptionnel d'ATF6 β est plus modéré mais il est plus stable et sera donc moins rapidement dégradé. En fait, l'expression d'ATF6 α et ATF6 β va être finement régulée afin de moduler la transcription des gènes de l'UPR avec ATF6 β dans le rôle du régulateur négatif d'ATF6 α [142]. Il est important de noter que l'activation d'ATF6 lors d'un stress du RE n'est pas encore claire. Deux modèles sont actuellement en confrontation. Le premier modèle est basé sur le fait que c'est la dissociation de BiP qui active ATF6. En effet, lorsque BiP est liée à ATF6 en conditions normales, les deux domaines d'adressage vers le Golgi présents dans le domaine luminal d'ATF6 sont masqués [109, 143]. En se dissociant, BiP découvrirait ces deux domaines d'ATF6, induisant son transport vers l'appareil de Golgi. Le second modèle se base sur la présence de ponts disulfures grâce à des cystéines présentes également dans le domaine luminal d'ATF6. En conditions normales, ces ponts disulfures permettraient la dimérisation (ou oligomérisation) de ATF6 alors ancrée dans la membrane du RE [144]. Dans cet état, ATF6 ne peut pas migrer vers l'appareil de Golgi et reste inactive. Lors d'un stress du RE, ces ponts disulfures seraient réduits, permettant la monomérisation d'ATF6 et son transport vers le Golgi afin d'être clivée par S1P et S2P [114].

En résumé, l'UPR, induite en réponse à un stress du RE, consiste en l'activation de trois voies, IRE1, PERK et ATF6, qui agissent en parallèle afin de transmettre le message de stress du RE vers le noyau. Ces trois effecteurs activent différentes protéines permettant de 1) atténuer le flux de protéines arrivant dans la lumière du RE, 2) augmenter les capacités de repliement des protéines mal repliées dans la lumière du RE et 3) augmenter les capacités de dégradation par le système ERAD des protéines mal repliées accumulées dans le RE.

Deux alternatives se présentent, soit l'homéostasie du RE est rétablie et il y a alors inactivation de ces trois effecteurs de l'UPR, soit le stress est toujours présent. Dans ce dernier cas, plutôt que de mettre en péril la survie de l'organisme, l'UPR déclenche différents programmes cellulaires induisant l'apoptose de la cellule.

e) Induction de l'apoptose par l'UPR

Lors d'un stress du RE prolongé ou sévère, l'UPR active parallèlement plusieurs voies de signalisation conduisant à l'induction de la mort cellulaire (Figure 18).

Une des voies apoptotiques est directement activée par IRE1, capable de recruter *tumour necrosis factor receptor* (TNFR)-*associated factor-2* (TRAF2). Ce complexe va permettre l'activation de la cascade de signalisation des *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et de la caspase 12, deux voies de signalisation permettant l'entrée en apoptose de la cellule [145, 146].

Une autre voie induisant la mort cellulaire implique la protéine CHOP dont l'expression est induite par IRE1 (via XBP1), PERK (via ATF4) et ATF6 [122, 129, 141]. CHOP va induire

l'expression de *death receptor* 5, une protéine faisant partie intégrante du programme d'apoptose [147]. En outre, CHOP va réprimer des protéines anti-apoptotiques (familles Bcl2) et stimuler le facteur pro-apoptotique Bim [148, 149].

Ces deux voies, la cascade JNK et l'activation de CHOP, conduisent également à l'activation de Bax et Bak. Ces deux protéines s'insèrent alors dans la membrane et activent *inositol trisphosphate receptor*, une canal protéique impliqué dans la libération du Ca²⁺ du RE [150]. Cette libération massive de Ca²⁺ dans la cellule induit l'activation d'une calpaïne qui à son tour active la cascade de signalisation des caspases, menant à l'apoptose [151, 152].



Figure 18 : Schéma récapitulatif des différentes voies de signalisation induites par l'UPR lors d'un stress du RE sévère ou prolongé conduisant à l'entrée en apoptose de la cellule. (D'après Schönthal, 2009)

d. Pathologies impliquant le stress du RE et l'UPR et traitements possibles

Depuis plusieurs années, le stress du RE et l'UPR sont retrouvés impliqués dans une multitude de pathologies humaines [153, 154] telles que le cancer [155, 156], les maladies neurodégénératives [157], cardio-vasculaires [158], inflammatoires [159], virales [160],

métaboliques [161] et pulmonaires [162, 163]. Dès lors, le contrôle exogène des différents effecteurs de l'UPR dans certaines pathologies apparaît comme une solution thérapeutique envisageable [164, 165]. Plusieurs revues bibliographiques citées ci-dessus traitent de l'implication de l'UPR dans diverses pathologies. Dans ce paragraphe, je ne citerai que quelques exemples concrets impliquant les principaux effecteurs de l'UPR ainsi que les thérapies potentielles associées.

a) Exemple de l'implication de BiP dans certains cancers

Depuis quelques années, bien que PERK, IRE1 et ATF6 soient impliqués dans le développement de certaines tumeurs, c'est surtout BiP qui fait l'objet de multiples investigations dans ce type de pathologie. En effet, plusieurs études ont montré que BiP était surexprimée dans des cancers tels que le cancer du poumon, de la prostate, du sein ou du foie [86]. Cette surexpression s'explique principalement par l'environnement des tumeurs dépourvu de glucose et d'oxygène. La surexpression de BiP, de par son rôle anti-apoptotique, augmente les capacités de prolifération, la survie et l'entrée en stade métastasique des cellules cancéreuses, et de ce fait est corrélée à un mauvais pronostique [166]. De plus, plusieurs études ont mis en évidence la présence de BiP à la surface des cellules cancéreuses, jouant un rôle de transduction de signaux anti-apoptotiques permettant la survie des cellules cancéreuses ainsi que la résistance des tumeurs aux chimiothérapies [167, 168].

Ces recherches ont permis d'aboutir à la découverte d'une combinaison de deux molécules thérapeutiques (OSU-03012 et un inhibiteur de la phosphodiestérase) très prometteuse. Les travaux de Booth et coll. ont permis de mettre en évidence que l'inhibition de BiP avait un réel impact bénéfique dans le traitement des cancers. Sur plusieurs types de cellules cancéreuses (neurones, cellules gastro-intestinales, uro-génitales, etc.), les auteurs ont pu constater que leur traitement détruisait exclusivement ces cellules par l'intermédiaire de l'inhibition de BiP [169].

b) Exemple de la voie IRE1 dans le diabète de type 2

L'insuline est une protéine sécrétée dans le flux sanguin par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas lors d'une hyperglycémie et permet d'augmenter l'absorption du glucose présent dans le sang par les cellules hépatiques, adipeuses ou musculaires. De par cette activité sécrétoire, ces cellules sont pourvues d'un RE très développé permettant de répondre à une forte demande en insuline. De plus, en raison de la forte productivité de ces cellules (1 000

000 de protéines d'insuline par minute et par cellule [170]), ces dernières sont régulièrement soumises à un stress du RE. C'est pourquoi l'UPR, permettant de lutter contre ce stress, doit fonctionner de manière optimale [154].

Dans cet exemple, nous nous intéressons au diabète de type 2 (dit non insulino-dépendant) caractérisé par une résistance à l'insuline de l'organisme et une destruction des cellules β du pancréas. Ce type de diabète est très souvent lié à une obésité résultante d'un régime alimentaire riche en gras et en sucre [171]. L'excès de sucre et de lipides lié à la surconsommation nutritionnelle, ainsi que l'inflammation et la libération d'ERO liées à l'obésité, conduisent au déclenchement de l'UPR dans les cellules hépatiques, adipeuses et pancréatiques chez ces patients [172].

Dans les cellules β , le stress du RE est principalement induit par l'activation de la voie IRE1. Ainsi, cette dernière est responsable de l'altération de bons nombres de processus impliquant la synthèse, le repliement, la sécrétion ou la dégradation de l'insuline, ce qui conduit à la diminution de la production d'insuline [173]. De plus, lorsque le stress se prolonge, IRE1 déclenche l'apoptose via CHOP et la cascade des JNK, entraînant la destruction des cellules β du pancréas [174].

Dans les cellules adipeuses et hépatiques, il a également été montré que la voie IRE1 altère la voie de signalisation du récepteur à l'insuline, participant ainsi à l'augmentation de la résistance à l'insuline dans ces cellules [175].

Evidemment, plusieurs autres mécanismes dépendant ou non de l'UPR entrent en jeu dans cette pathologie. Cependant, la modulation d'une ou plusieurs protéines de la voie IRE1 représente une piste thérapeutique intéressante. En 2014 par exemple, une équipe chinoise travaillant sur des rats souffrant de cardiopathies liées au diabète a inhibé la voie IRE1, ce qui a permis d'améliorer la fonction cardiaque des rats [176].

c) Exemple de PERK dans la maladie d'Alzheimer

La voie PERK de l'UPR est connue pour être impliquée dans plusieurs pathologies, la plus connue étant le syndrome de Wolcott-Rallison. Brièvement, ce syndrome se caractérise notamment par une destruction précoce des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas entraînant un diabète de type 1. Dans cette pathologie rare induite par la mutation du gène codant la protéine PERK, cette dernière n'est plus en mesure de phosphoryler la sous-unité α d'eIF2. Il en résulte une régulation altérée de la synthèse protéique et une accumulation

d'insuline dans le RE causant un stress. Ce dernier induit l'UPR qui à terme conduit à l'apoptose des cellules entrainant ainsi le diabète [177].

PERK a également été retrouvée impliquée dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer [178]. Cette dernière se caractérise principalement par une perte progressive des capacités de mémorisation et cognitives des patients, occasionnée entre autres par la présence de plaques amyloïdes extracellulaires et une accumulation intracellulaire de la protéine Tau [6]. C'est cette accumulation qui est en partie responsable du stress du RE et du déclenchement de l'UPR retrouvés dans les neurones de patients, avec notamment la surexpression de BiP et de la voie PERK [7]. Le lien entre PERK et les symptômes de la maladie d'Alzheimer ne sont pas encore clairs mais l'activation de cette voie de l'UPR serait à l'origine d'une diminution de la synthèse protéique dans les neurones entraînant une diminution de la fonction synaptique. En outre, l'activation de PERK occasionne l'activation d'ATF4 et de CHOP, induisant l'apoptose et la dégénération neuronale [179]. Ainsi, une équipe a pu montrer en 2015 que l'inhibition chimique (par le GSK2606414) spécifique de PERK permettait une réduction de la neuro-dégénération chez des souris traitées développant des symptômes semblables à ceux de la maladie d'Alzheimer [180].

L'inhibition de PERK et/ou de la phosphorylation d'eIF2 dans la maladie d'Alzheimer n'est qu'un exemple. Comme dit plus haut, PERK est retrouvée augmentée dans d'autres pathologies neurodégénératives et des traitements par l'inhibition semblent être une piste prometteuse.

d) Exemple d'ATF6 dans l'ischémie-reperfusion

Comparé à BiP, IRE1 et PERK, très peu d'études rapportent l'implication d'ATF6 dans des pathologies. Cette différence est probablement due au fait que cette voie de l'UPR est moins étudiée que les deux autres. Certains auteurs se sont tout de même penchés sur la question et ont montré que la voie ATF6 de l'UPR est impliquée dans la résistance des glioblastomes à la radiothérapie [181]. ATF6 serait également impliquée dans des processus de réplication virale dans les cellules eucaryotes [182].

Une des dernières études en date portant sur ATF6 a démontré que cet effecteur de l'UPR avait un rôle protecteur en diminuant les effets délétères de l'ischémie-reperfusion [183]. Cette dernière est notamment associée à une importante quantité d'ERO, toxiques pour la cellule. Les auteurs de l'étude ont montré que l'inhibition d'ATF6 dans des cardiomyocytes de souris augmentait les dommages cellulaires et la mort cellulaire par nécrose. La diminution des

altérations liées à l'ischémie-reperfusion passerait notamment par l'induction de la catalase, une protéine permettant de lutter contre les ERO, par ATF6. A la suite d'une analyse par micropuce, les auteurs montrent qu'ATF6 permet l'induction de plusieurs autres gènes impliqués dans la protection cellulaire face aux ERO. Cette étude suggère un nouveau rôle d'ATF6 dans la lutte contre le stress oxydatif.

Les molécules activatrices et inhibitrices développées par le laboratoire de Peter Walter à San Francisco se sont révélées être très spécifiques d'ATF6 α [184]. Les *ceapins* sont en effet capables d'inhiber l'activation d'ATF6 α sans affecter IRE1 ni PERK [185]. Ces modulateurs d'ATF6 α sont les premiers à être réellement spécifiques de cette branche de l'UPR et pourront être testés dans des pathologies où ATF6 est suspectée d'être impliquée.

e) TRPM7 et ATF6

Une récente étude de 2016 a démontré que l'expression du *transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7* (TRPM7) (Figure 19) était diminuée dans un autre modèle d'ischémie [186]. Ce canal kinase ubiquitaire est le principal régulateur de la concentration intracellulaire en magnésium (Mg^{2+}) ($[Mg^{2+}]_i$), notamment en faisant entrer le Mg^{2+} dans la cellule [187]. Il est activé par une faible $[Mg^{2+}]_i$ et inhibé par une forte $[Mg^{2+}]_i$ [188]. Par ailleurs, il est impliqué dans divers processus cellulaires [189] tels que l'autophagie [190], la maturation neuronale [191] et de nombreux cancers [192, 193].



Figure 19 : Schéma simplifié de la structure de TRPM7. En N-terminal, un domaine melastatine suivi de six domaines transmembranaires. Le pore est constitué par le S5 et S6. En C-terminal, un domaine TRP suivi d'un domaine coiled-coil (superhélice) et un domaine kinase contenant un NBD. (D'après Park et coll, 2014)

ATF6 étant activée lors d'épisodes ischémiques, l'hypothèse de l'existence d'un lien entre l'inhibition de TRPM7 et l'activation d'ATF6 semble concorder avec une autre étude où l'inhibition chimique de TRPM7 conduit notamment à l'activation de BiP, ATF6 et XBP1 [194]. D'autres études ont également montré que l'inhibition de TRPM7 par ARN interférence augmente l'expression de CHOP et induit l'apoptose [195].

Comme dit précédemment, l'UPR est également impliquée dans certaines pathologies pulmonaires, et notamment la mucoviscidose. Cette maladie, que je vous présenterai dans la troisième partie de cette introduction, est utilisée comme modèle d'étude des deux projets composant cette thèse.

III. La mucoviscidose

a. Généralités

Bien que l'apparition de cette maladie soit très ancienne selon les estimations [196], les premiers écrits faisant part de cette pathologie remontent (seulement) au Moyen Âge, témoignant notamment des tristement célèbres enfants dits ensorcelés et au baiser salé [197]. Il faut cependant attendre 1936 pour que le Dr. Guido Fanconi réalise une réelle première description de la maladie [198]. Fanconi observe deux atteintes majeures, une fibrose pancréatique et une dilatation des bronches. En 1938, le Dr. Dorothy Andersen confirme ces observations et donne un nom à cette maladie : fibrose kystique du pancréas [199], donnant lieu au nom anglais de la maladie *cystic fibrosis* (CF). Le terme mucoviscidose (composé des mots mucus et visqueux et utilisé dans plusieurs langues, dont le français) provient du Dr. Syndney Farber qui est convaincu que la maladie est associée à une viscosité du mucus globale plutôt qu'à une fibrose pancréatique [197].

Par la suite, plusieurs découvertes conséquentes ont pu permettre l'avancée des connaissances sur la mucoviscidose. En 1946, Andersen démontre que la maladie suit un mode autosomal récessif [200]. En 1959, Gibson et Cook mettent au point le principal test de dépistage de la maladie (test de la sueur) en se basant sur les travaux de Di Sant'Agnese et coll. [201]. Ces derniers avaient pu mettre en évidence six ans plus tôt la présence d'un excès de sel (NaCl) dans la sueur des patients atteints de mucoviscidose [202]. Ce test permet de mesurer dans la sueur la concentration en ions chlorures (Cl'), retrouvée plus élevée chez les patients à cause d'une imperméabilité au Cl⁻ des cellules épithéliales des glandes sudoripares (test positif pour des [Cl⁻]> à 60 mM) [203]. Deux ans auparavant, Knowles et coll. avaient démontré que la différence de potentiel nasal (DPN) était augmentée chez les patients. Les auteurs en ont conclu que cette différence était occasionnée par une augmentation de l'absorption d'ions sodiques (Na⁺) par les cellules épithéliales nasales chez les patients [204]. Ces deux études ont permis de mettre en évidence pour la première fois un défaut de transport et d'échange des ions dans cette maladie.

Enfin, c'est une équipe de Toronto qui fournit une explication quant à l'origine moléculaire de la mucoviscidose. Un des premiers pas fut la découverte en 1985 de la localisation du gène *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (cftr)* dans la région 3 du bras long du chromosome 7 (locus 7q31.2) par Lap-Chee Tsui et coll. [205]. Le travail de Tsui et ses

a) La mucoviscidose à travers le temps...

collègues se concrétise en 1989 par une avancée majeure dans la compréhension de la mucoviscidose avec le clonage du gène *cftr* et la mise en évidence de la mutation F508del présente chez approximativement 70 % des patients [206-208]. Cette mutation est caractérisée par une délétion de trois nucléotides dans le gène *cftr*, se traduisant par la perte d'une phénylalanine (F) en position 508 de la protéine CFTR. Cette mutation conduit à une protéine CFTR-F508del composée de 1 479 AAs au lieu de 1 480 pour le CFTR-WT (forme sauvage=*Wild type*). La délétion de ce seul AA est responsable d'une forme sévère de mucoviscidose et la plus répandue à travers le monde.

b) ... et à travers le monde

La mucoviscidose est souvent présentée à raison comme la maladie autosomale récessive létale la plus fréquente dans la population caucasienne, avec une incidence atteignant un enfant sur 2 500 naissances par an dans cette population (Figure 20).



Figure 20 : Graphique représentatif des différences d'incidence de la mucoviscidose entre les différentes ethnies humaine. (D'après CDC Cystic Fibrosis, 2007)

En Europe, cette incidence est plus faible avec à 1 enfant atteint sur 3 500 naissances par an [209], mais des disparités sont observées au sein de ce continent. Ainsi, la Finlande compte un nouveau cas sur 25 000 naissances atteint alors qu'en France un enfant sur 4 500 naissances est atteint par la mucoviscidose [210]. De la même manière, il existe en France des différences d'incidence selon les régions. Selon les données de 2015 du Registre Français de la Mucoviscidose, l'incidence dans le Languedoc-Roussillon est de 1/8 000 naissances alors qu'en Bretagne, région très touchée par cette pathologie, elle est de 1/3 000 naissances. Cette disparité régionale est représentée sur la Figure 21 qui montre la prévalence (nombre de personnes malades pour 100 000 habitants) en France en 2015.



Figure 21 : Prévalence de la mucoviscidose en France selon le Registre français de la mucoviscidose 2015.

Quand on parle de mucoviscidose, ce terme regroupe les 2 017 mutations connues à ce jour (*http://www.genet.sickkids.on.ca*). Il est fort probable qu'au moment où vous lirez ces lignes ce nombre de mutations aura encore augmenté. La distribution de ces mutations n'est pas égale. Comme mentionné plus haut, la mutation la plus fréquente rencontrée dans la mucoviscidose est la mutation F508del. En 2015 en France, cette mutation est présente en au moins une copie chez 83,3 % des patients (proportion : 41,9 % homozygotes F508del et 41,4 % hétérozygotes F508del/Autre), selon le Registre Français de la Mucoviscidose Figure 22. Toujours selon ce même registre, parmi les 2 017 mutations recensées, seule une quinzaine (autres que F508del) représentent plus de 1 % des patients. Les deux mutations F508del et G551D indiquées sur la Figure 22 sont celles qui ont servi de modèle dans ce projet de thèse.

| Mutations | Nombre de patients * | Proportion (en %) |
|----------------|----------------------|-------------------|
| F508del | 5453 | 83.3 % |
| G542X | 353 | 5.4 % |
| N1303K | 279 | 4.3 % |
| 2789+5G->A | 159 | 2.4 % |
| 1717-1G->A | 136 | 2.1 % |
| R117H | 130 | 2.0 % |
| R553X | 120 | 1.8 % |
| G551D | 113 | 1.7 % |
| W1282X | 92 | 1.4 % |
| 3849+10kbC->T | 88 | 1.3 % |
| 3272-26A->G | 80 | 1.2 % |
| Y122X | 74 | 1.1 % |
| L206W | 71 | 1.1 % |
| D1152H | 69 | 1.1 % |
| l507del | 69 | 1.1 % |
| 2183AA->G | 64 | 1.0 % |
| 711+1G->T | 62 | 0.9 % |
| R1162X | 57 | 0.9 % |
| R347P | 56 | 0.9 % |
| 3120+1G->A | 48 | 0.7 % |
| G85E | 45 | 0.7 % |
| R334W | 45 | 0.7 % |
| 3659delC | 43 | 0.7 % |
| A455E | 42 | 0.6 % |
| Y1092X | 41 | 0.6 % |
| S945L | 39 | 0.6 % |
| 1078delT | 36 | 0.5 % |
| 1811+1.6kbA->G | 36 | 0.5 % |
| R347H | 36 | 0.5 % |
| 394delTT | 33 | 0.5 % |
| W846X | 29 | 0.4 % |
| 621+1G->T | 27 | 0.4 % |
| S1251N | 25 | 0.4 % |
| E60X | 24 | 0.4 % |
| R1066C | 24 | 0.4 % |
| L997F | 19 | 0.3 % |
| 1677delTA | 18 | 0.3 % |
| E585X | 18 | 0.3 % |
| G1244E | 18 | 0.3 % |
| 2711delT | 17 | 0.3 % |

Figure 22 : Tableau présentant les mutations de la mucoviscidose les plus fréquentes dans la population française en 2015. Le nombre de patients prend en compte les personnes ayant au moins une copie de la mutation considérée. Encadrées en rouge, les mutations F508del et G551D sont celles étudiées dans ce projet de thèse. (Modifié d'après le Registre Français de la Mucoviscidose, 2015)

b. Le gène *cftr* et la protéine CFTR

a) Structure et fonctionnement de la protéine CFTR
(1) Structure

Le CFTR est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC), c'est-à-dire que l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire au fonctionnement du canal. Ces transporteurs ABC partagent une structure similaire, ils sont tous composés de deux domaines transmembranaires (en anglais *transmembrane domain* (TMDs) également abrégé *membrane spanning domain* (MSDs)), et deux NBDs permettant la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. En plus d'être le seul transporteur ABC à exporter des ions à l'extérieur de la cellule, le CFTR est également le seul canal de cette famille qui possède un domaine appelé domaine régulateur (R) situé entre le NBD1 et le TDM2 (Figure 23) [211].



Figure 23 : Schéma représentatif de la structure primaire (a) et la structure 3D transmembranaire (b) de la protéine CFTR. (D'après Ratjen et al, 2015)

Chaque TMD est composé de six hélices α hydrophobes transmembranaires (TM) reliées entre elles par des boucles intra ou extracellulaires Figure 24. Les deux TMD ancrent le

CFTR dans la membrane et forment le pore par lequel les anions sont transportés vers l'extérieur de la cellule [212].



Figure 24 : Modèle théorique de la structure du CFTR-WT. (D'après Serohijos et al, 2008)

A l'instar des extrémités N et C-terminales, les deux NBDs du CFTR sont cytosoliques. Ces domaines vont permettre la fixation de l'ATP dont l'hydrolyse (pas de manière égale sur les deux NBDs) est nécessaire à l'ouverture du canal. Ces deux NBD sont constitués chacun de deux sous-domaines : un sous-domaine composé d'hélice α et un sous-domaine constituant le site catalytique où sont notamment retrouvés les fameux motifs de Walker. Ces sites A et B de Walker permettent la fixation de l'ATP et du Mg²⁺ jouant le rôle de co-facteur catalytique [213]. Enfin, le domaine R présente une structure désordonnée avec quelques hélices α . L'importance du domaine R réside principalement dans ses nombreux sites de phosphorylation. Les possibles

interactions du domaine R avec les domaines NBD1, NBD2 et l'extrémité C-terminale du CFTR en font un domaine central dans la régulation du canal CFTR [214].

(2) Fonctionnement

L'ouverture et la fermeture du canal CFTR requiert deux éléments : la phosphorylation du CFTR et la liaison de l'ATP sur les NBDs.

En effet, la première condition permettant l'ouverture du canal est la phosphorylation du domaine R. Cette phosphorylation est réalisée principalement par les protéines kinases A (PKA) et C (PKC). La phosphorylation du domaine R permettrait de faciliter la liaison de l'ATP aux NBDs [215].

Concernant la fixation de l'ATP, le modèle admis actuellement décrit un changement conformationnel à la suite de la liaison de l'ATP sur les NBDs Figure 25. La fixation de l'ATP sur le NBD1 et le NBD2 induit la dimérisation de ces deux domaines, ce qui entraîne un changement de la structure 3D des TMDs et permet ainsi l'ouverture du canal CFTR. Lorsque l'ATP est hydrolysée, la liaison NBD1-NBD2 est déstabilisée, ce qui permet la libération de l'ADP. Cette libération induit un retour dans un état conformationnel des TMDs permettant la fermeture du canal CFTR. Ce seraient les boucles intracellulaires (2 et 4) du CFTR qui réaliseraient la transduction du message entre la dimérisation des NBDs et le changement conformationnel des TMDs [216].



Figure 25 : Schéma du modèle d'ouverture et de fermeture du canal CFTR. Lorsque les NBD ne fixent aucune molécule d'ATP le canal est en position fermé. La fixation de l'ATP sur NBD1 et NBD2 va entraîner leur dimérisation. Cette dernière provoque un changement conformationnel des deux TMD permettant ainsi l'ouverture du canal. Une fois l'hydrolyse de l'ATP et le retrait de l'ADP effectués, le canal revient en position fermé. (D'après Moran, 2017)

b) Biogénèse et contrôle qualité du CFTR

(1) Biogénèse et insertion

Du gène à la protéine, la biosynthèse du CFTR est complexe et nécessite l'intervention d'une multitude de protéines chaperons. Cette biosynthèse du CFTR fait intervenir plusieurs entités cellulaires : le noyau, le cytosol, la membrane du RE, la lumière du RE, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique (Figure 26).



Figure 26 : Schéma simplifié de la biosynthèse du CFTR. Y figurent les différents compartiments cellulaires impliqués dans cette synthèse. Le gène est transcrit dans le noyau et l'ARNm traduit dans le cytosol. Le CFTR subit ensuite une maturation dans le RE puis est exporté vers l'appareil de Golgi avant de rejoindre la membrane apicale des cellule épithéliales. (D'après Pranke et al, 2014)

Le gène *cftr* est composé de 27 exons répartis sur 250 kilobases (kb) [217]. Une fois le gène transcrit dans le noyau, l'ARNm de 6,1 kb est épissé puis exporté vers le cytosol où il est pris en charge par des ribosomes. Le CFTR étant une glycoprotéine destinée à rejoindre la

membrane, son passage par le RE est obligatoire. Le CFTR est inséré co-traductionnellement dans la membrane du RE de la même manière que sur la Figure 5 (I. b. a).

Pour ce faire, TM1 se lie à la SRP par l'intermédiaire de son peptide signal puis est inséré dans le pore de translocation Sec61, suivi par le TM2. L'insertion dans la membrane fonctionne par paire. Ainsi, lorsque les deux TM sont dans le pore, ils sont insérés dans la membrane du RE. Dans la plupart des cas, le TM1 ne parvient pas à fixer la SRP, c'est donc le TM2 (qui possède également un peptide signal) qui est fixé par la SRP. Le TM2 est ainsi transloqué en premier dans le Sec61 puis le TM1 est inséré de manière post-traductionnelle. Le pore s'ouvre ensuite latéralement et les deux TM (1 et 2) sont insérés dans la membrane du RE (Figure 27).



Figure 27 : Schéma de l'insertion des deux premiers TMs du CFTR dans la membrane du RE. A gauche, le TM1 est fixé à la SRP et donc inséré en premier dans le Sec61, suivi par le TM2 : l'insertion est co-traductionnelle. A droite, le TM1 n'a pas fixé la SRP. C'est le TM2 qui en ayant fixé la SRP est inséré en premier dans le pore (insertion co-traductionelle) puis le TM1 est inséré (insertion post-traductionnelle). Une fois les deux TM dans le pore, ce dernier s'ouvre est les deux TM sont insérés. (D'après Lu et al, 1998)

Le cas serait similaire pour les TM3 et TM4. L'insertion des TMs continue jusqu'à ce que les six TMs du TMD1 du CFTR soient insérés dans la membrane du RE [218]. Le NBD1 et le domaine R sont ensuite traduits dans le ribosome et se replient co-traductionnellement. Puis les six TMs du TMD2 sont insérés dans la membrane du RE, suivi du NBD2 qui se replie également co-traductionnellement [219]. Lorsque la quatrième boucle extracellulaire est dans la lumière du RE, le CFTR subit une première glycosylation à partir de cette boucle. La protéine passe de 130 kDa (bande A) à environ 145 kDa (bande B) [220].

A la fin de son insertion dans la membrane du RE, le CFTR est positionné de sorte que les extrémités N et C-terminales ainsi que les domaines NBD1, NBD2, R et les boucles intracellulaires, soient dans le cytoplasme. Les boucles extracellulaires sont dans la lumière du RE (Figure 28).



Figure 28 : Schéma des différentes étapes de l'insertion du CFTR dans la membrane du RE. Le TMD1 est d'abord inséré. Le NBD1 et le domaine R se replient co-traductionnellement dans le cytosol. Le TMD2 est ensuite inséré dans la membrane du RE. Enfin, le NBD2 se replie co-traductionnellement dans le cytosol. (Modifié d'après Farinha et Canato, 2017)

(2) Contrôle qualité

Dès sa synthèse et son insertion dans la membrane du RE, le CFTR est directement pris en charge par des protéines chaperons cytosoliques telles que *heat shock cognate* (HCS) 70, HSP70 et *human DnaJ homolog* (Hdj) 2. Ces protéines ont pour fonction d'assister le repliement co-traductionnel des différents domaines cytosoliques du CFTR. HSC70 est notamment impliquée dans la dégradation des protéines cytosoliques mal repliées [221]. Cette protéine est souvent associée à son co-facteur *C-terminus of Hsc70-interacting protein* (CHIP), une ubiquitine ligase E3. Cette dernière est notamment responsable de l'ubiquitinylation des protéines mal repliées afin qu'elles soient dégradées par le protéasome [222].

D'autres protéines chaperons cytosoliques telles que des *FK506 binding protein* (FKBP8), HSP90 et ses co-chaperonnes *Activator of Hsp90 ATPase Homologue* (Aha1) et *prostaglandin E synthase 3* (PGES 3), participent à la maturation finale du CFTR, et notamment à l'assemblage post-traductionnel des différents domaines cytosoliques [223].

Dans la lumière du RE, c'est surtout le système CNX/CRT/UGGT qui permet le contrôle du repliement du CFTR grâce au « glycocode » de la cupule glucidique (cf I. b. c). Des protéines résidentes du RE telles que BiP, GRP75 et plusieurs autres protéines chaperons ont été retrouvées dans des immunoprécipitats du CFTR (Figure 29) [224].



Figure 29 : Réseau des protéines chaperons impliquées dans le contrôle et/ou le repliement du CFTR (non exhaustif). Les lignes bleues symbolisent une interaction directe ou indirecte avec le CFTR. Les lignes rouges représentent les interactions entre les différentes protéines. Les ovales roses indiquent les protéines facilitant le repliement du CFTR. (D'après Wang et al, 2006)

Un troisième système de contrôle du CFTR est mis en œuvre juste avant sa sortie du RE vers le Golgi. Ce contrôle est basé sur l'exposition de motifs type Arginine/X/Arginine (R/X/R) où X représente n'importe quel AA. Si ces motifs sont reconnus, le CFTR ne peut être exporté vers le Golgi. Un dernier contrôle est effectué avant le transport du CFTR dans les vésicules COPII. Sec24, une protéine impliquée dans ce transport, reconnaît une séquence spécifique Asparagine/Alanine/Asparagine (DAD). Si cette séquence n'est pas conforme, l'association du CFTR avec Sec24 est diminuée, allant jusqu'à l'abolition de son transport vers le Golgi [225].

Une fois ces quatre points de contrôle passés, le CFTR est exporté du RE vers l'appareil de Golgi où il subira une dernière glycosylation, augmentant son poids moléculaire à environ 170 kDa (bande C), caractéristique de la forme mature du CFTR [220]. Une fois les différents sous-compartiments de l'appareil de Golgi traversés, le CFTR est exporté vers la membrane plasmique. Cependant, il semblerait qu'il existe différentes voies moins communes par lesquelles le CFTR serait exporté vers la membrane apicale des cellules [226].

c) Principales fonctions du CFTR

(1) Canal anionique

La fonction du CFTR est avant tout d'assurer le transport d'anions de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Le CFTR exporte de nombreux anions tels les ions iodures (Γ), bromures (Br^{-}), bicarbonates (HCO_{3}^{-}), nitrates (NO_{3}^{-}), thiocyanates (SCN^{-}) et le glutathion (GSH). L'ion le plus important reste l'ion Cl⁻ [215].

Le transport de Cl⁻ (en synergie avec les ions Na⁺ par un couplage fonctionnel avec *epithelium* Na^+ *channel* (ENaC)) à travers la membrane intervient dans plusieurs fonctions dont le maintien du volume du liquide de surface des voies aériennes (Figure 30). Par extension, les ions Cl⁻ libérés par le CFTR vont intervenir majoritairement dans les mouvements d'eau à la surface des cellules épithéliales.



Figure 30 : Schéma simplifié de la régulation du volume d'eau du mucus par la sécrétion d'ions $C\Gamma$ et Na^{\dagger} . Chez les personnes saines (en haut), la sécrétion de $C\Gamma$ par le CFTR et l'inhibition qu'il exerce sur ENaC permet l'hydratation du mucus. Chez les personnes CF (en bas), l'altération du CFTR inhibe la sécrétion d'ions $C\Gamma$ et lève l'inhibition de ENac. Cela induit une absorption excessive de Na^{\dagger} ainsi qu'une déshydratation du mucus. (D'après Buchanan et al., 2009)

Concernant le transport des ions HCO₃⁻, ces derniers vont notamment intervenir dans la régulation du pH en alcalinisant diverses solutions telles que les sucs pancréatiques ou la bile. Cette alcalinisation est d'une importance capitale dans les processus de digestion mais également dans les voies aériennes. Les ions HCO₃⁻ participent en effet à la structuration du mucus en se complexant à la mucine, composante majeure du mucus. Ainsi, le manque d'HCO₃⁻ dû à l'altération de la fonction du CFTR accentue les effets de la déshydratation et augmente la viscosité du mucus des voies aériennes. Le mucus intestinal est également concerné par l'altération de la sécrétion d'ions HCO₃⁻ [227, 228].

Le CFTR, par l'intermédiaire du transport des ions SCN⁻ et du GSH, intervient dans la mise en place des premières lignes de défense de l'organisme. Les ions SCN⁻, en tant que précurseurs de l'hypothiocyanite, participent à la lutte antimicrobienne. Le GSH est un tripeptide qui permet de contrer les effets oxydants des ERO libérées en grande quantité dans les voies aériennes lors d'épisodes inflammatoires [229].

Le CFTR n'est pas perméable aux ions Mg²⁺, mais en tant que co-facteur de l'hydrolyse de l'ATP nécessaire à l'ouverture du CFTR, ce cation divalent représente un élément de régulation majeur de la fonction du CFTR. Des études de patch clamp ont d'ailleurs montré que l'ajout de Mg²⁺ dans la cellule permettait d'augmenter significativement les courants Cl⁻ liés au CFTR (en présence d'ATP) [230]. L'implication du Mg²⁺ dans l'hydrolyse de l'ATP par le CFTR avait également été démontrée par Schulz et al en 1996 [231].

De plus, l'expression de l'ARNm et de la protéine CFTR est également modulée par la $[Mg^{2+}]_i$. L'utilisation du ionophore A23187 permettant d'augmenter la $[Mg^{2+}]_i$, induit une diminution des ARNm et de la protéine CFTR [232].

La $[Mg^{2+}]_i$ doit donc être finement régulée afin d'optimiser l'expression et la fonction du CFTR dans les cellules exprimant cette protéine.

(2) Régulation d'autres canaux ioniques

Le CFTR intervient également dans la régulation d'autres protéines membranaires, et plus particulièrement de canaux ioniques.

On peut citer notamment la protéine *epithelium* Na⁺ *channel* (ENaC), localisée à la membrane des cellules épithéliales et responsable de l'absorption des ions Na⁺. Chez des personnes saines, le CFTR inhibe partiellement l'activité des canaux ENaC. A l'inverse, chez les patients atteints de mucoviscidose, le CFTR étant altéré, cette inhibition est levée. Il en résulte une absorption

excessive de Na⁺ par les cellules épithéliales, augmentant ainsi les phénomènes de déshydratation observés dans cette pathologie.

Outre ENaC, plusieurs autres canaux tels que les Ca^{2+} -activated Cl⁻channels (CaCC), outwardly rectifying chloride channel (ORCC), les échangeurs HCO₃⁻/Cl⁻, renal outer medullary protassium channel (ROMK), etc. sont régulés par le CFTR (Figure 31). Le terme regulator de CFTR choisi par Riordan et ses collègues tire son origine de cette la capacité du CFTR a interagir avec les autres canaux ioniques afin de réguler la conductance transmembranaire et maintenir une homéostasie ionique des cellules épithéliales [233]. Lorsque le CFTR est altéré, cela induit un déséquilibre important des flux ioniques [234].

| Transport Protein Affected | Interaction | |
|---|---|--|
| ENaC | Inhibition of ENaC | |
| Na ⁺ /H ⁺ exchanger | Inhibition of Na ⁺ /H ⁺ exchanger | |
| HCO ₃ ′Cl⁻ exchanger | Activation of HCO3/Cl- exchanger | |
| ICOR Cl ⁻ channels | Activation of ICOR, conferring glibenclamide sensitivity | |
| Ca2+- and volume-activated Cl- channels | Activation/inhibition of Ca^{2+} and swelling-activated Cl^- channels | |
| ROMK2, Kir6.1 | Converring glibenclamide sensitivity to ROMK2 and Kir6.1 | |
| K _v LQT1 | Activation of K _v LQT1 in oocytes | |
| AQP3 | Activation of AQP3 | |
| Gap junction channels | Activation of gap junctions | |
| Mucus secretion | Exocytosis and mucus secretion | |
| ATP transport | ATP release by epithelial cells | |
| Glutathione transport | Activation of glutathione efflux | |

Figure 31 : Exemples de canaux ioniques ou de transports transmembranaires régulés par le CFTR. (D'après Kunzelmann, 2001)

c. Le CFTR F508del

a) Généralités

Comme dit précédemment, la mutation F508del est la mutation la plus fréquente parmi les 2017 mutations du CFTR recensées à ce jour. F508del appartient aux mutations de classe II, c'est-à-dire que le trafic du CFTR est altéré et ce dernier, retenu dans le RE, n'atteint pas la membrane plasmique (Figure 32).



Figure 32 : Image de microscopie confocale sur des macrophages humains représentant le CFTR (en blanc) et le noyau (en bleu). A gauche, le CFTR-WT est exprimé à la membrane plasmique. A droite, le CFTR-F508del est retenu dans le RE près du noyau. (D'après Del Porto et al, 2011)

La mutation F508del est localisée dans le domaine cytoplasmique NBD1 du CFTR. La protéine résultante de cette mutation est caractérisée par un poids moléculaire de 145 kDa, correspondant à une glycosylation partielle. Cette dernière est la marque d'un CFTR qui n'a pas de conformation 3D correcte et qui n'est donc pas exporté vers l'appareil de Golgi.

Une des premières conséquences de cette mutation est observée lors du repliement du CFTR-F508del. En effet, lors de sa synthèse et son insertion dans la membrane du RE, l'assemblage des différents domaines du CFTR ne s'effectue pas correctement. La mutation n'altère pas de manière significative la structure du NBD1 mais en revanche déstabilise la liaison entre le NBD1 et la boucle intracellulaire 4 du TMD2 [212]. Il en résulte des variations conformationnelles et une altération globale de l'assemblage des différents domaines du CFTR-F508del. Ce dernier est alors mal replié dans la membrane du RE et reconnu par les protéines chaperons. Ces chaperonnes et co-chaperonnes montrent d'ailleurs une plus forte et plus longue interaction avec le CFTR-F508del qu'avec le CFTR-WT, et seraient ainsi en partie responsables de la dégradation du CFTR par le système ERAD [235]. Ainsi, le sodium phénylbutyrate (4-PBA), connu pour restaurer partiellement le CFTR-F508del à la membrane cellulaire, agit notamment en inhibant HSC70. Cela confirme que cette protéine chaperon est en partie responsable, par son interaction avec CHIP, du blocage de la maturation et de la dégradation du CFTR-F508del [236]. Un autre exemple est celui de l'inhibition de Aha1, un co-facteur des HSP90 impliqué dans le repliement du CFTR. Cette inhibition entraîne la restauration du CFTR-F508del à la membrane [224].

Bien que la majorité du CFTR-F508del soit dégradée lors du premier contrôle via les chaperons cytosoliques, il semblerait qu'une autre voie de rétention et de dégradation du CFTR-F508del s'effectue par l'intermédiaire de la CNX, ayant une plus forte affinité pour le CFTR-F508del. En guise d'exemple, le miglustat permet *in vitro* la maturation et l'exportation à la membrane du CFTR-F508del en inhibant son interaction avec la CNX [237]. L'administration orale de cette molécule à des souris CF a montré une augmentation de la masse osseuse et de la vitesse de fabrication osseuse [238].

La modulation de l'expression de ces protéines chaperons semble être une voie thérapeutique prometteuse. D'autres inhibiteurs de HSC70 tels que l'apoptazole, le matrine ou la déoxyspergualine ont tous montré des effets positifs sur la maturation du CFTR-F508del [235].

b) CFTR-F508del et UPR

La rétention du CFTR-F508del dans le RE pourrait déclencher l'UPR. C'est en effet une des hypothèses émises depuis quelques années. Cette idée se base notamment sur le fait que l'UPR est déclenchée à la suite d'une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Dans le cas de la mutation F508del, la protéine est mal conformée et s'accumule dans le RE. Bien qu'encore controversée en raison d'une dégradation trop rapide du CFTR-F508del par le protéasome, cette hypothèse est néanmoins renforcée par le fait que plusieurs autres facteurs peuvent influer sur le déclenchement de l'UPR. En effet, même si l'accumulation de CFTR-F508del dans le RE n'était pas suffisante pour déclencher l'UPR, cette dernière peut en revanche être activée par le diabète, l'inflammation, les infections ou les ERO chez les patients atteints de la mucoviscidose. L'accumulation de différents facteurs de stress du RE peut permettre d'atteindre le seuil de déclenchement de l'UPR.

Plusieurs équipes ont donc cherché à savoir si l'UPR ou certaines voies de l'UPR étaient activées dans la mucoviscidose F508del.

En 2006, Nanua et coll. observent une activation anormale de l'UPR dans des cellules épithéliales de voies aériennes de donneurs homozygotes pour la mutation F508del. Les auteurs ont observé que l'expression des ARNm de XBP1 et CHOP étaient augmentées dans les cellules CF [239]. En travaillant sur deux lignées cellulaires (IB3-1 et C38), une autre équipe est parvenue aux mêmes résultats concernant la surexpression de ces protéines [240]. En revanche, ces deux études ne révèlent pas d'augmentation de l'expression de BiP, IRE1 ou PERK dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. Concernant BiP, bien qu'elle soit retrouvée dans l'interactome du CFTR-WT et F508del [241], il semblerait que cette protéine n'intervienne pas
dans le repliement du canal. Cependant, Kerbiriou et coll. ont montré dans une étude de 2007 qu'en plus de l'activation de la voie ATF6, l'expression de BiP était augmentée dans des cellules A549 exprimant un CFTR-F508del. L'observation de la surexpression de BiP est concordante avec les mesures réalisées par Gomes-Alves et coll. en 2010 sur des BHK-WT et BHK-F508del [242]. Une autre équipe a montré que la surexpression de F508del induisait l'expression de gènes codant BiP et XBP1 [243].

En résumé il semblerait que seules BiP et la voie ATF6 de l'UPR soient activées dans des cellules F508del. De manière intéressante, Kerbiriou et coll. avaient également montré que l'inhibition d'ATF6 par ARN interférence permettait une restauration partielle de la présence du CFTR-F508del à la membrane des cellules. Ces résultats sont en accord avec deux études ayant montré que le stress du RE et l'UPR répriment la transcription et altèrent la maturation du CFTR-WT et F508del [244]. Les mêmes auteurs ont montré l'année suivante qu'en se fixant sur le promoteur du *cftr*, ATF6 exerce une inhibition transcriptionnelle du CFTR par l'intermédiaire de processus d'acétylation des histones et de méthylation de l'ADN [245].

Dans des cellules exprimant un CFTR-F508del, 99 % de ce dernier est dégradé, et n'est donc pas exporté à la membrane [246]. Le peu de CFTR-F508del à la membrane ainsi que ses différents défauts fonctionnels entraînent plusieurs manifestations chez les personnes atteintes par la mucoviscidose.

d. Les atteintes

De par la fonction cruciale du CFTR au sein des cellules épithéliales, les mutations altérant l'activité de cette protéine ont un impact majeur sur le fonctionnement général des cellules épithéliales et celui de certains organes des patients.

Bien que l'atteinte principale soit d'ordre respiratoire, il est important de préciser qu'il s'agit d'une maladie causant des atteintes multiples de divers organes, nécessitant donc une prise en charge globale du patient : kinésithérapie, antibiothérapie, régime alimentaire adapté, etc. Selon la gravité et la présence ou non des symptômes, il est important de noter que ces atteintes sont très variables d'un patient à l'autre [247]. De plus, selon la mutation du *cftr*, les atteintes diffèrent. Ainsi, les mutations de classe I (pas de synthèse du CFTR), II (défaut de synthèse du CFTR) et III (défaut de fonction du CFTR) vont entraîner une forme de mucoviscidose dite sévère (atteintes respiratoires et pancréatiques fortes). A l'inverse, les mutations de classe IV (CFTR muté moins fonctionnel que le WT) et V (CFTR muté moins exprimé que le WT) vont permettre de conserver entre 3 et 10 % de l'activité du CFTR muté (comparé au CFTR-WT). La forme de mucoviscidose associée à ces classes de mutations est moins sévère [248].

a) Respiratoires

L'atteinte respiratoire est la manifestation qui induit le plus de mortalité chez les patients en France [249]. Le CFTR participe au maintien du volume du liquide de surface par la sécrétion d'ions CI⁻ et Na⁺ (ENaC). Ce transport ionique permet l'hydratation du liquide de surface du tractus broncho-pulmonaire. Ce liquide, faisant office d'interface entre l'air et les cellules épithéliales, participe notamment aux défenses de l'organisme. Grâce aux cils des cellules épithéliales, ce mucus est évacué vers la trachée. Chez les patients, l'altération de la fonction du CFTR induit un défaut de transport ionique entraînant une mauvaise hydratation du mucus des voies aériennes. L'hyperviscosité du mucus qui en résulte rend l'évacuation de ce dernier bien plus difficile (diminution de la clairance muco-cilliaire), entraînant l'accumulation du mucus dans les bronches [250]. Un environnement propice aux développements microbiens se crée, conduisant à une inflammation et une augmentation du risque d'infections polymicrobiennes. En effet, les bronches sont caractérisées par une extraordinaire richesse et une grande diversité des espèces bactériennes, virales et fongiques. Un cercle vicieux est alors entretenu conduisant à la destruction progressive des tissus qui elle-même entraîne une insuffisance respiratoire fatale pour le patient (Figure 33) [251, 252].



Figure 33 : Schématisation des conséquences d'une dysfonction de la protéine CFTR dans le tractus broncho-pulmonaire chez des patients. Le transport ionique est altéré, ce qui conduit à une mauvaise hydratation du mucus. Ce dernier s'accumule dans les bronches et crée une inflammation et un environnement favorable aux développements de micro-organismes. Il en résulte une dégradation progressive des tissus pulmonaires. (D'après Lopez-Pacheco)

b) Digestives

La mucoviscidose est souvent associée à une dysfonction du système bronchopulmonaire, de par la mortalité liée à cette atteinte. Il ne faut cependant pas oublier qu'une des plus anciennes traces connues de cette pathologie, celle de l'anatomiste Pieter Pauw en 1595, relate le décès d'une fillette de onze ans survenu à la suite d'une atteinte pancréatique [197]. Les organes digestifs tels que le système hépatobiliaire, le pancréas et le système gastrointestinal ne sont pas épargnés par la maladie (Figure 34) [253].



Figure 34 : Diagramme représentant l'impact de l'altération de la fonction du CFTR sur le pancréas, le système hépatobiliaire et le système gastro-intestinal (de gauche à droite). (D'après Sathe et Freeman, 2016)

(1) Pancréatiques

Près de 85 % des patients atteints de mucoviscidose sont touchés par une insuffisance pancréatique [254]. Les deux principales manifestations de l'atteinte pancréatique se caractérisent par une mauvaise absorption des nutriments et une fibrose du pancréas. En plus de sa fonction endocrine (sécrétion d'insuline), le pancréas a une fonction exocrine ayant pour but de libérer dans l'intestin des sucs pancréatiques constitués d'enzymes digestives. Chez une personne saine, le CFTR a pour fonction d'hydrater ces sucs pancréatiques grâce au transport de Cl⁻. De plus, le CFTR alcalinise la solution d'enzymes digestives dans le but de limiter leur précipitation (grande concentration d'enzymes) et de neutraliser les sucs gastriques acides. Cette alcalinisation essentielle est réalisée grâce à la sécrétion d'ions HCO₃⁻ par le CFTR. Chez les patients, le CFTR étant altéré, il n'y a pas ou peu de sécrétion de Cl⁻, donc pas assez d'hydratation des sucs pancréatiques, ce qui conduit à une très forte concentration des enzymes digestives dans les sucs pancréatiques. De plus, les ions HCO₃⁻ ne sont plus sécrétés, ce qui entraine un mauvais fonctionnement des enzymes digestives. Il en résulte une malabsorption des nutriments, conduisant à des carences alimentaires et les complications qui leurs sont liées (maladies, anémies, ostéoporose, etc.). L'agrégation des enzymes (par un pH trop acide et une trop forte concentration enzymatique créée par le manque d'eau) conduit à une obstruction des canaux pancréatiques, ce qui entraîne une fibrose du pancréas. Il y a également autodestruction du pancréas par les enzymes qui stagnent [255].

Cette fibrose peut s'étendre jusqu'au pancréas endocrine. La destruction des cellules β des îlots de Langerhans entraîne l'apparition d'un diabète chez les patients [256].

(2) Hépatobiliaires

Responsables de 3 % des décès des patients, les atteintes hépatobiliaires représentent la seconde cause de mortalité liée à la mucoviscidose en France [249]. Le CFTR n'est pas exprimé dans le foie mais dans la vésicule et les canaux biliaires. De la même manière que pour les canaux pancréatiques, la fonction du CFTR est de réguler le volume d'eau de la bile par les ions Cl⁻ et Na⁺, et l'alcalinisation essentielle de la bile par la sécrétion des ions HCO₃⁻. Chez les patients, l'altération du CFTR se caractérise par une bile épaisse (due au manque d'hydratation) et pas assez alcaline. Il en résulte une stagnation de la bile, l'apparition d'ERO et une augmentation de la toxicité liée aux composants de la bile. Cette toxicité s'étend aux cellules biliaires, puis aux hépatocytes et entraîne une inflammation pouvant engendrer à long terme une fibrose, une cirrhose et la destruction progressive du foie [257].

(3) Gastro-intestinales

A l'instar des atteintes hépatiques, les manifestations gastro-intestinales ont été mises en évidence à la suite de l'augmentation de l'espérance de vie des patients. Parmi les nombreuses atteintes gastro-intestinales, les plus fréquentes sont le reflux gastro-œsophagien, le syndrome d'obstruction intestinale distale et le bouchon méconial (ileus meconium). Le reflux gastro-œsophagien est provoqué par une augmentation du temps de présence du bol alimentaire dans l'estomac, la prise de médicament et une toux constante. L'altération du CFTR chez les patients entraîne la sécrétion d'un mucus épais responsable notamment de la formation d'un bouchon méconial chez les nouveaux-nés. Le syndrome d'obstruction intestinale distale, également appelé équivalent du bouchon méconial, est retrouvé chez 16 à 21 % des patients et présente les mêmes origines que le bouchon méconial [258].

c) Génitales

L'atteinte génitale est une des plus fréquentes manifestations liées à un défaut du CFTR, notamment chez les patients masculins. En effet, environ 98 % d'entre eux présentent une absence congénitale bilatérale des canaux déférents se traduisant par une azoospermie obstructive. Cela reste une hypothèse, mais la stérilité entraînée par cette atteinte aurait comme origine l'obstruction des conduits par un mucus trop épais [259].

e. Thérapies protéiques du CFTR

Les traitements actuels apportés aux patients sont pour la plupart symptomatiques et bien qu'ils aient permis une augmentation considérable de l'espérance de vie des patients, ils ne sont pas encore suffisants pour permettre un mode de vie normal. Ainsi, depuis un certain temps déjà, une partie des recherches s'oriente vers des thérapies protéiques ciblant directement le CFTR afin de supprimer ou atténuer fortement les atteintes liées à l'altération du CFTR. Ces thérapies doivent être adaptées, comme cité plus haut, aux différentes classes de mutations du CFTR existantes (Figure 35).



Figure 35 : Schéma récapitulatif des six classes de mutation répertoriées en fonction de l'impact sur le CFTR. La figure présente aussi l'impact majeur sur le CFTR, les principales mutations concernées et l'approche thérapeutique adoptés pour chaque classe de mutations. Les deux classes de mutations encadrées en rouge (II et III) sont les classes concernées par ce projet de thèse. (D'après Lopez-Pacheco, 2016)

Dans ce projet de thèse, les modèles d'étude ont porté sur la mutation F508del (classe II) et G5551D (classe III). Je ne vais donc vous présenter que les pistes thérapeutiques en lien étroit avec ces deux mutations, c'est-à-dire les correcteurs, les potentiateurs et les stabilisateurs du CFTR.

a) Correcteurs

Les correcteurs du CFTR concernent le traitement des mutations de classe II. L'enjeu majeur dans la recherche de correcteurs du CFTR réside notamment dans le fait que la mutation F508del, présente chez plus de 80 % des patients, fait partie de cette classe de mutation. Cette dernière est caractérisée par le fait que le CFTR muté, de par sa conformation alternative, est retenu dans le RE par le système de contrôle qualité des protéines. Une des nombreuses raisons poussant à évaluer l'efficacité de potentiels correcteurs est que le CFTR-F508del est un peu fonctionnel lorsqu'il est exporté à la membrane cellulaire. Plusieurs molécules telles que le glycérol, le 4-PBA, la thapsigargine, le triméthylamine N-oxyde ont déjà montré des résultats remarquables en promouvant l'exportation du CFTR à la membrane [260]. Cependant, le caractère relativement toxique de ces molécules ne permet pas une mise sur le marché. Plusieurs

autres molécules ont pu être testées au cours des dernières années et le Lumacaftor (VX-809) développé dans les laboratoires de Vextex Pharmaceuticals a montré de très bons résultats *in vitro*. *In vivo* en revanche, cette molécule n'a pas montré d'effets significatifs sur l'amélioration de la fonction pulmonaire [261].

Les études en cours portent également sur une autre molécule de Vertex Pharmaceuticals, le Tezacaftor (VX-661) qui a montré une diminution de la concentration en ions Cl⁻ dans la sueur de patients homozygote F508del après un mois de traitement par cette molécule [262].

b) Potentiateurs

Les potentiateurs visent dans un premier temps les mutations de classe III (et IV). Dans ces mutations, le CFTR est synthétisé et exporté à la membrane, mais il n'est pas ou peu fonctionnel. La mutation la plus fréquente de la classe III est la G551D, présente chez un peu plus de 3 % des patients. A l'heure actuelle, une seule molécule (développée par Vertex Pharmaceuticals), l'Ivacaftor (ou VX-770), commercialisée sous l'appellation Kalydeco, a montré une réelle efficacité de traitement des patients atteints de la mutation G551D. Le traitement par cette molécule, induisant une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal, a montré une augmentation significative du volume expiratoire et a pu être commercialisée en 2012 pour ces patients. Depuis 2015, l'Ivacaftor est également prescrit pour d'autres mutations de classe III [263].

c) Stabilisateurs

Les stabilisateurs du CFTR concernent le traitement des mutations de classe VI. Dans cette classe de mutation, le CFTR est normalement synthétisé, exporté à la membrane et fonctionnel. Cependant, le CFTR est très peu présent à la membrane car il est rapidement endocyté en raison de son instabilité. Un des stabilisateurs actuellement en évaluation est le Cavosonstat (N91115). Cette molécule développée par Nivalis Therapeutics permet l'augmentation de la stabilité du CFTR à la membrane en inhibant la S-Nitrosoglutathion réductase [264].

d) Associations de classes de médicaments

La recherche ces dernières années tend à ne plus utiliser les différentes molécules décrites ci-dessus seules mais en association entre elles. Ainsi, comme cité plus haut, le Lumacaftor n'a pas montré de résultats significatifs en monothérapie mais son association avec l'Ivacaftor a montré des résultats plutôt encourageants chez des patients homozygote F508del. Les résultats de phase II et III ont en effet montré que les patients traités avec l'association du Lumacaftor et de l'Ivacaftor présentent une concentration en ions Cl⁻ moindre dans la sueur et une amélioration significative de la fonction pulmonaire (volume expiratoire) [265]. L'association du correcteur et du potentiateur, commercialisée sous l'appellation Orkambi, a reçu une autorisation de mise sur le marché aux USA en 2015 (*www.fda.gov*).

L'association d'un correcteur et d'un potentiateur semble être une piste thérapeutique très prometteuse. Cependant, une étude de 2014 a montré que cette association pourrait être davantage efficace si les potentiateurs, dont l'Ivacaftor, n'altéraient pas la correction et la stabilité du CFTR [266]. Une étude clinique de phase II est d'ailleurs en cours afin de tester l'association de l'Ivacaftor, du Lumacaftor et du Cavosonstat [267].

Les différentes approches de ces thérapies protéiques semblent être prometteuses pour l'avenir et certaines de ces molécules sont même déjà commercialisées (Figure 36).



Figure 36 : Tableau récapitulatif des principales molécules correctrices ou potentiatrices du CFTR. Le tableau présente dans quelle phase clinique était la molécule en 2016. (Modifié d'après Fajac et al, 2017)

PROBLEMATIQUES DE LA THESE

Dans la première partie de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à l'UPR, une réponse physiologique déclenchée par un stress du RE. Ce mécanisme permet l'activation de différentes voies de signalisation dont chaque élément est coordonné dans le but de rétablir l'homéostasie du RE. Depuis quelques années, l'implication de l'UPR dans diverses pathologies a été démontrée. Dans ces maladies, les différentes protéines intervenant dans l'UPR ont montré des rôles aussi bien protecteurs que délétères. Ainsi, le contrôle des différentes effecteurs de l'UPR apparaît aujourd'hui comme une piste thérapeutique très prometteuse. Dans cette étude, nous avons voulu explorer l'impact de ce contrôle dans la mucoviscidose.

La mucoviscidose est une pathologie causée par une mutation du gène *cftr* affectant l'ensemble des épithéliums de l'organisme. Le gène muté code une protéine CFTR dont la fonction est altérée, ce qui conduit à la perturbation de nombreux processus cellulaires et aux atteintes connues de la maladie. La mutation F508del, la plus fréquente du *cftr*, est caractérisée par une conformation 3D du CFTR incorrecte conduisant à sa rétention dans le RE et sa dégradation par le protéasome.

En raison de nombreux facteurs endogènes (accumulation de protéines dans le RE) ou exogènes (inflammation, infection, diabète, etc.), plusieurs études ont montré que l'UPR, et notamment la voie ATF6, étaient déclenchées dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. Ces études ont également permis de mettre en évidence qu'ATF6 réprime transcriptionnellement le CFTR.

La branche ATF6 de l'UPR est donc au cœur de la relation directe existant entre le stress du RE, l'UPR et la protéine CFTR-F508del. ATF6 constitue donc une cible d'investigation importante en rapport avec la mucoviscidose.

Dans la première partie de cette étude, nous avons donc cherché à inhiber la voie ATF6 de l'UPR et à mesurer l'impact de cette répression sur la maturation et la fonction du CFTR-F508del.

En parallèle de cette première partie, nous nous sommes intéressés à la $[Mg^{2+}]_i$ et à TRPM7 dans la mucoviscidose, ce qui n'avait encore jamais été réalisé.

Nous avons vu précédemment que peu d'études ont été réalisées sur ATF6 et TRPM7 mais elles semblent montrer l'existence d'un lien entre ces deux protéines : l'inhibition de TRPM7 conduit à la surexpression de certaines protéines de l'UPR telles que BiP, ATF6, XBP1 et CHOP, ces mêmes protéines sont surexprimées dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. Des voies communes sont ainsi induites entre des cellules exprimant un CFTR-F508del et des cellules dont TRPM7 a été inhibé. Etant donné que TRPM7 est régulé par la [Mg²⁺]_i, nous avons émis l'hypothèse que des dérégulations de la [Mg²⁺]_i pourraient activer BiP et la voie ATF6 par

l'intermédiaire de TRPM7 dans des cellules exprimant un CFTR muté.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons choisi de séparer ce projet en deux grandes questions (cf. schéma ci-dessous).



Dans un premier temps, il était nécessaire de mesurer la $[Mg^{2+}]_i$ dans le but de savoir si oui ou non des dérégulations du Mg^{2+} étaient observées dans différents mutants du CFTR. Dans un second temps, il s'agira de faire le lien entre la $[Mg^{2+}]_i$, TRPM7 et ATF6, ce qui constitue un nouveau projet de recherche. Pour ma part j'ai participé aux investigations portant sur la première question.

Le premier objectif de cette seconde partie était de donc de mesurer pour la première fois la $[Mg^{2^+}]_i$ dans des cellules exprimant un CFTR. Pour cela, nous avons choisi le CFTR-WT et deux mutants : le CFTR-F508del et le CFTR-G551D.

Si une différence de $[Mg^{2+}]_i$ était constatée, deux questions se poseraient. Quelle peut être l'origine de cette différence et quel serait son impact sur la fonction du CFTR ?

RESULTATS

I. Partie 1 : ATF6 dans la mucoviscidose

Introduction

Le premier objectif de cette thèse était de mesurer l'impact de l'inhibition chimique d'ATF6 sur l'expression et la fonction du CFTR-F508del. Ce canal protéique est altéré à la suite de la mutation F508del du gène *cftr*, mutation la plus fréquente chez les personnes atteintes de la mucoviscidose.

Le CFTR-F508del est mal replié et retenu par le système de contrôle qualité du RE et dégradé par le protéasome. Plusieurs études ont montré que l'UPR et plus particulièrement la voie ATF6 étaient activées dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. De plus, ATF6 réprime transcriptionnellement le CFTR.

L'inhibiteur choisi pour répondre à cette problématique est le fluorure de 4-(2aminoéthyl)benzènesulfonyle (AEBSF). Cet inhibiteur non spécifique d'ATF6 agit en inhibant son clivage par S1P, empêchant ainsi son activation.

Résultats

Le premier point était de valider l'induction de l'UPR et de la voie ATF6 dans notre modèle cellulaire, des lignées cellulaires *cystic fibrosis bronchial epithelial* (CFBE). Pour ce faire, nous avons mesuré par Western blot l'expression de BiP (marqueur principal du déclenchement de l'UPR), de la forme totale d'ATF6 (ATF6-90 kDa) et de sa forme active (ATF6-50 kDa). Les trois protéines ont montré une expression significativement augmentée dans les CFBE-F508del, prouvant l'activation de l'UPR et de la voie ATF6 dans ces cellules.

Afin de déterminer les conditions optimales d'utilisation de l'AEBSF, nous avons ensuite mesuré l'expression de ces trois protéines à différents temps après traitement des cellules avec cet inhibiteur. Les résultats obtenus indiquent une diminution significative de l'expression d'ATF6-50 kDa après une heure de traitement. Quatre heures de traitement sont nécessaires pour diminuer significativement l'expression de BiP. Les résultats sont plus mitigés pour ATF6-90 kDa.

Après avoir choisi un temps de traitement, nous avons évalué l'impact de ce traitement sur la fonction du CFTR-F508del par *whole patch-clamp*, puis sur son expression à la membrane par immunoprécipitation membranaire. Les résultats ont montré une augmentation significative des courants Cl⁻ et de la présence du CFTR entièrement glycosylé à la membrane après un traitement des cellules exprimant un CFTR-F508del avec l'AEBSF.

Enfin, par électrophorèse bi-dimensionnelle (2D) couplée à la spectrométrie de masse, nous avons isolé et identifié six protéines dont l'expression varie significativement à la suite du traitement. Ces protéines sont principalement des protéines chaperons résidentes du RE impliquées dans le repliement des protéines.

Discussion

Tout d'abord, nos résultats confirment la participation d'ATF6 dans les processus de rétention du CFTR-F508del dans le RE.

Ensuite, les résultats obtenus ouvrent de nouvelles voies quant à l'utilisation de modulateurs d'ATF6, ou de l'UPR en général, dans la mucoviscidose mais également dans d'autres pathologies.

Inhibition of ATF6-mediated Unfolded Protein Response improves F508del-CFTR's function in Cystic Fibrosis Cells

Florentin Huguet^{1,2,3}, Mathieu Kerbiriou^{1,2*}, Marie-Laure Calvez^{1,3}, Nathalie Benz^{1,3}, Claude Férec^{1,2,4,5}, Pascal Trouvé^{1*}

¹ Inserm, UMR 1078, Brest, F-29218, France

² Université de Bretagne Occidentale, Faculté de Médecine et des sciences de la santé, Brest, F-29200, France

³ Association Gaétan Saleün, Brest, F-29218, France,

⁴ CHRU Brest, Hôpital Morvan, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Brest, F-29200, France

⁵ Etablissement Français du Sang - Bretagne, Brest, F-29200, France

* Corresponding authors

Pascal Trouvé (<u>pascal.trouve@univ-brest.fr</u>) Mathieu Kerbiriou (<u>mathieu.kerbiriou@univ-brest.fr</u>) Inserm UMR 1078, Génétique, Génomique Fonctionnelle et Biotechnologies, 46 rue Félix Le Dantec, 29218 Brest, France Tel.: +33 (0)2 98 22 36 79

Acknowledgements

This work was partly supported by the French foundations "Vaincre La Mucoviscidose" and "Gaétan Saleün". We would like to thank the PurIProB core facility (Inserm UMR1078, Brest, France) for its technical support.

Abstract

Activating transcription factor 6 (ATF6) is an endoplasmic reticulum (ER) transmembrane protein involved in the Unfolded Protein Response (UPR) which is activated during ER stress caused by an accumulation of misfolded proteins in the ER. In cystic fibrosis (CF), the retention of the F508del-mutated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein within the ER, triggers UPR which negatively regulates the expression of CFTR. ATF6 is involved in CFTR repression and understanding this inhibitory mechanism is of great interest to develop a therapeutic approach based on UPR regulation. Using the serine protease inhibitor 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) we investigated the impact of ATF6 inhibition on both function of F508del-CFTR and membrane localization. First, using immunoglobulin heavy chain-binding protein (BiP) and ATF6 as UPR markers, we showed that F508del-CFTR expression triggers the UPR in CFBE41o-/F508del cells. Then, we observed the inhibitory effect of AEBSF on UPR due to an inhibition of the ATF6 pathway, in CFBE410-/F508del treated cells. Moreover, we showed that both membrane localization and function of F508del-CFTR are partially restored when ATF6 activation is impaired by AEBSF. In conclusion, our data demonstrate the altered function and membrane localization of F508del-CFTR can be restored by the inhibition of ATF6. Our results were further confirmed using a specific S1P inhibitor (PF-429242). Therefore, we propose that the inhibition of the UPR's sensor ATF6, as well as the inhibition of its cleavage, is a potential target for the treatment for CF patients expressing the F508del mutation.

Keywords: cystic fibrosis; CFTR; F508del-CFTR; Unfolded Protein Response; ATF6

Abbreviations: 2-ME, 2-mercaptoethanol; ABC, ATP-binding cassette; AEBSF, 4-(2aminoethyl)benzenesulfonylfluoride; ATF4, activating transcription factor 4; ATF6, activating transcription factor 6; ATP, adenosine triphopsphate; Bip, immunoglobulin heavy chain-binding protein; BSA, bovine serum albumin; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CF, cystic fibrosis; CFTR, CF transmembrane conductance regulator; CHOP, CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein; CI⁻, chloride; eIF2α, alpha subunit of the eucaryotic initiation factor 2; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; ERQC, ER quality control; ERSE, ER stress response element; G3PDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GRP78, glucose regulated protein of 78 kDa; HRP, horseradish peroxidise; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; NF-kB, nuclear factor-kappa B; PBS, phosphate buffer saline; PERK, protein kinase RNA-like ER kinase; S1P, site-1 protease; S2P, site-2 protease; SEM, standard error of the mean; TBST, Tris-buffered saline with Tween 20; UPR, unfolded protein response; UPRE, UPR response element; WT, wildtype.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most common inherited lethal genetic disease in the Caucasian population. This autosomal recessive disease is caused by mutations in the *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (*CFTR*) gene [1]. To date, more than 2,009 mutations have been identified in the *CFTR* gene resulting in expression and/or function defects of the CFTR protein (http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html). The CFTR protein belongs to the adenosine triphopsphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporters' family and has several functions. It mainly acts as a chloride (CI') channel regulated by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and participates in ion exchange at the apical membrane of epithelial cells [2, 3]. In CF patients, the CFTR malfunction causes a defect in the CI[°] secretion via CFTR, which leads to the thickening of the secreted mucus and promotes infections and inflammation.

In eukaryotic cells the endoplasmic reticulum (ER) is an organelle involved in the synthesis and assembly of membrane and secreted proteins [4]. These processes are tightly controlled by the ER quality control (ERQC) system to ensure the proper conformation and function of proteins [5, 6]. This system is especially important because an accumulation of malformed proteins in the ER lumen, which could result of several disruptions in ER homeostasis, represents a threat to the cell called ER stress [7]. If that occurs, in order to cope with this stress, the cell triggers a series of physiological signalling and transcription events increasing ER refolding abilities, maturation and degradation (synthesis of chaperones, etc.) known as unfolded protein response (UPR) [8-10].

The UPR is a normal physiological process which tends to restore ER homeostasis and consists of the transcription activation of target genes encoding ER chaperones residents, proteins of glycosylation, proteins of the secretory pathway and constituents of the ER-associated degradation (ERAD) system [11-16]. In mammals, the UPR moreover allows a fast and intense repression of protein synthesis which limits the entry of new proteins in the ER and therefore avoids overloading it [17, 18]. The UPR, which is also triggered during inflammatory and infectious processes [19-22], can also induce apoptosis when the stress is too intense or continues in the cell [23, 24].

The main sensor and regulator of this response, the molecular chaperone immunoglobulin heavy chain-binding protein/glucose regulated protein of 78 kDa (BiP/GRP78) [25-28], detects the ER stress. In addition, three ER membrane proteins are able to detect the protein assembly status in the ER lumen and convey this information to two

primary effectors systems: ER stress response element (ERSE) and UPR response element (UPRE) [29]. These are the protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) [30], inositol-requiring enzyme 1 (IRE1 α/β) [31] and activating transcription factor 6 (isoforms α and β) [32], which define the three axes of the UPR in mammals: a PERK induced translational pathway and two transcriptional pathways composed of IRE1 and ATF6 [33]. In unstressed cells, PERK, IRE1 and ATF6 are associated with BiP and maintained in an inactive state [34, 35]. During cellular stress, misfolded proteins accumulate in the ER lumen and bind to BiP, causing the release and activation of the three other actors of the UPR which initiates adaptive responses [36-38]. Note that by its interactions with PERK, IRE1 and ATF6, the heat shock protein BiP is considered as the main regulator of the UPR and is commonly used as an ER stress marker [39, 40].

In CF the most common mutation (around 80% of patients) corresponds to the expression of the F508del-CFTR protein which is misfolded and retained in the ER [41]. Several studies showed that this retention triggers the UPR [42-44]. Interestingly, ER stress and the UPR are involved in inflammation, which is characteristic of CF, notably by activating the nuclear factor-kappa B (NF-kB) [45-50] which itself has the capacity to trigger response pathways related to ER stress [19, 20]. Besides, it was shown that the F508del-CFTR expression and its accumulation in the ER contribute to NF-kB activation and to the inflammatory signalling [51]. In addition, the UPR is activated during infectious processes, also characteristic of CF [21, 22]. Indeed, CF patients suffer from chronic infections stimulating defence mechanisms. This led to the development of an exacerbated inflammatory response involved in tissue degradation, particularly in the lungs, and eventually leads to respiratory failure, the leading cause of death in CF patients. These studies highlight the relevance to work on the UPR in CF and underline the fact that finding strategies to regulate the UPR and restore ER homeostasis could represent a therapeutic approach for CF patients.

Interestingly, different studies showed that ATF6, one of the three sensors of the UPR, negatively regulates CFTR expression at both mRNA and protein level, making ATF6 a potential therapeutic target for CF [42, 52, 53]. To act as a transcriptional activator on UPR genes ATF6 has first to be activated. After dissociation from BiP, full length ATF6 (90 kDa) migrates to the Golgi [35, 36, 54] where it is sequentially cleaved by Site-1 and Site-2 proteases (S1P and S2P) [55-57]. Then the cleaved and active form of 50 kDa acts in the nucleus where it binds to ERSE and UPRE located in the promoters of UPR target genes thereby inducing transcription of a network of genes [10, 58-62]. It includes genes encoding

ER chaperones (like *HSPA5*) and *XBP1* which could also be induced by IRE1 and enhances the transcription of UPR genes involved in protein quality control, disulfide linkage, ERAD and lipid synthesis [10, 63, 64]. ATF6 could also induce apoptosis through CCAAT/enhancerbinding protein homologous protein (CHOP) transcriptional induction [65, 66], even if the activation of activating transcription factor 4 (ATF4), which is induced by the PERK mediated phosphorylation of the alpha subunit of the eucaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) (decreasing the overall protein synthesis), is thought to play a dominant role in the induction of CHOP in response to ER stress [67].

The present work is based on the results showing the inhibitory effect of the UPR effector ATF6 on both expression and function of CFTR. Our goal was to clarify the mechanism of CFTR inhibition by ATF6 in the CF cell model CFBE410- [42, 52, 53]. ATF6 is indeed a key component in the regulation of CFTR expression under stress conditions and its inhibition would represent a potential therapeutic target for CF, as confirmed by the results showing a partial restoration of the F508del-CFTR channel activity when ATF6 is reduced [42].

To study the ATF6 pathway of the UPR and its impact on CFTR function in a CF cells model, a pharmacological manipulation to this specific branch of the UPR was utilized. Thus we used the serine protease inhibitor 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) (also known as Pefabloc SC) to inhibit S1P and thus the ATF6 pathway of the UPR [68, 69]. In the present study we have shown that AEBSF improves F508del-CFTR function in CF cells. Furthermore, results in this study show that this partial restoration of the F508del-CFTR activity is explained by an increased expression of the mature form of CFTR in the membrane of the cells. Therefore, the inhibition of ATF6 in CF stressed cells could represent a potential treatment for CF patients expressing the F508del-CFTR. We also showed using a proteomic approach, that the rescue of F508del-CFTR is accompanied and explained by the modulation of the expression of proteins implicated in mRNA maturation and splicing (HNRNPH1, HNRH3) and involved in the folding and the degradation of F508del-CFTR (PDIA3, HSP7C, GRP75 and HSP71), in link to UBC which is a CFTR modifier gene.

Materials and methods

Cell culture and regents

The CFBE41o- cells purchased from Professor D.C. Gruenert (San Francisco, CA, U.S.A.) were human bronchial epithelial cells endogenously expressing the F508del-CFTR

antibody (H-300) (#SC-20757, SantaCruz Biotechnology), Rabbit polyclonal anti-GRP78 antibody (H-129) (#SC-13968, SantaCruz Biotechnology). Membranes were further incubated 1h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody diluted in PBST (1/20,000): Goat anti-rabbit (#A0545, Servilab). Blots were developed by enhanced chemiluminescence kit (ECL Plus, GE Healthcare) and analyzed using Chemi-Smart 5100 ECL imaging system (Vilber Lourmat). The relative intensity of each band was quantified by densitometry using BIO-1D software (Vilber Lourmat). Each value was normalized by blue coomassie staining or the G3PDH signal obtained in the same lane on the same blot probed with mouse monoclonal antibody anti-G3PDH (#H86504M, Meridian Life Science[®], Inc.) diluted in PBST (1/30,000).

Patch-clamp experiments

Whole-cell patch-clamp recordings were obtained with the patch clamp system Port-a-Patch[®] (Nanion Technologies GmbH, Germany) as previously described [74, 75]. Untreated or AEBSF treated cells were incubated with the external solution (140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 5 mM D-glucose monohydrate, pH 7.4, 298 mOsmol) before recording. The internal solution used was 50 mM CsCl, 10 mM NaCl, 60 mM Cs-Fluoride, 20 mM EGTA, 10 mM Hepes/CsOH, and 5 mM Mg-ATP (Mg salt); pH 7.2; 285 mOsmol. CFTR activation and CFTR inhibition was done using the CFTR-activator (10 mM forskolin and 30 mM genistein both from Sigma) and the CFTR-inhibitor (10 mM CFTRinh172, Sigma) solution respectively, that were added to the external solution. Voltage steps (100 ms) from a holding potential of - 80 mV, from -80mV to +80 mV (10 mV increments) were applied. Data were captured using the Patchmaster program (Nanion Technologies GmbH, Germany) and currents normalized by membrane capacitances to remove variability due to differences in the cell sizes. Results were presented as graphic representations of I/V relationship and as bar graphs after statistical analysis of the normalized values, at +80mV.

Cell surface detection of CFTR

BHK cells stably expressing WT-CFTR or F508del-CFTR were graciously given by Dr. John W. Hanrahan (McGill University). A 3-Haemaglutinin (HA)-epitope tag was inserted in the fourth extracellular loop of CFTR in these cell lines [76]. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Lonza, Switzerland) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were washed three times with cold 1X PBS (Eurobio, France) plus bovine serum albumine (BSA, 0,5%) and incubated 1h at 4°C with an anti-HA antibody

obtained from a CF patient homozygous for the F508del mutation [51,52]. The cells used in experiments were the transduced CFBE41o-/WT also called CFBE41o-/corrected (CFBE41o-/corr) and CFBE41o-/F508del cells, and were cultured as previously described [53]. These cells will be also called cells expressing Wt-CFTR and cells expressing F508del-CFTR in the manuscript. Cell culture media and supplements were purchased from Lonza (Basel, Switzerland) and CliniSciences (Nanterre, France). To inhibit ATF6 activation, cells were incubated with 300µM of the serine protease inhibitor 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) purchased from Servilab. In some experiments, ATF6 activation was blocked by the use of 10µM PF-429242 (4-[(Diethylamino)methyl]-N-[2-(2-methoxyphenyl)ethyl]-N-(3R)-3-pyrrolidinylbenzamide, from Tocris)

Immunoblotting

Untreated or AEBSF treated cells were rinsed twice with cold PBS. For total cell lysate preparation, cells were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Na-Deoxycholate, 0.1 % SDS, 10 mM iodoacetamide, 100 µM PMSF) supplemented with fresh protease-inhibitor cocktail (Complete tablets - EDTA free, Roche, Basel, Switzerland) added extemporaneously at a final concentration of 40 μ l/ml (30 min on ice). Lysates were centrifugated (15 min, 16000g, 4°C). For nuclear preparation, cells were washed twice with cold PBS, and lysed with buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 2mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.20 % NP40 and protease-inhibitor cocktail) during 15 min at 4°C. Lysates were then centrifuged (1,500×g, 2 min, 4°C) and the supernatants (cytosolic fraction) were removed in a new tube. The pellet was washed twice in buffer B (Buffer A without NP40) and lysed with buffer C (20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂ 450 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 25 % Glycerol and protease-inhibitor cocktail) during 1h vortexing 2200 rpm. Lysates were then centrifuged (14,000xg, 10 min, 4°C) and supernatant (nuclear fraction) was removed in a new tube. Protein concentrations were determined using Lowry's methodology with the bovine serum albumin used as a standard [54].

For each sample equal amount of total or nuclear proteins was loaded on a polyacrylamide gel and resolved by SDS-PAGE (10 %). Samples were then transferred onto a PVDF membrane (EMD Millipore, Billerica, Massachusetts, United States). After blotting, membranes were blocked with 5 % (w/v) non-fat dried skimmed milk in PBS-0.1 %Tween20 (PBST). Blots were then probed overnight at 4°C with the primary antibodies listed hereafter: Rabbit polyclonal anti-ATF6 antibody (#09-069, EMD Millipore), Rabbit polyclonal anti-S1P

(BioLegend, USA) diluted (1/250) in 1X PBS plus 0,5% BSA. Cells were washed three times with cold 1X PBS, scraped and centrifugated (300xg, 3min, 4°C). Cells pellets were suspended in RIPA buffer for 30 min on ice, centrifuged (16000xg, 15min, 4°C) and total protein concentration of supernatant was determined using Lowry's method, using BSA as a standard. Protein G magnetic beads (Thermo Fisher Scientific, USA) were equilibrated with cold RIPA buffer. Lysates were then incubated with the magnetic beads (100µl of magnetic beads per mg of total protein) at 4°C during for 2h. Beads were then rinsed three times in cold RIPA buffer and proteins were eluted with 2X sample buffer containing 2-mercaptoethanol (20min, 37°C). Finally, eluates were subjected to SDS/PAGE (7,5%) and transfered onto a PVDF membrane. Membrane was blocked with 5% (w/v) dried skimmed milk in PBS (0.1 %) with Tween20, probed overnight at 4°C with the anti-HA antibody (1/500) in 5% non-fat dried milk in PBST. Membranes were further washed and incubated 1h at RT with HRP conjugated anti-mouse antibody (1/20000; Santa Cruz Biotechnology, USA). Blots were developed by enhanced chemiluminescence kit (ECL Plus, GE Healthcare, USA) and analyzed using Chemi-Smart 5100 ECL imaging system (Vilber Lourmat, Germany).

Two-dimensional Gel Electrophoresis (2-DE) and Mass Spectrometry

100 µg of total proteins from untreated or AEBSF treated cells were used for experiments. Each protein sample was first diluted in DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) which contains optimized concentrations of urea, thiourea, CHAPS, DeStreak Reagent and appropriate IPG buffer. Passive rehydration of Immobiline DryStrip gels (7 cm, pH 3-10 NL, GE Healthcare) with samples was performed during 8 hours. Once rehydration completed, Immobiline DryStrip gel are transferred in the Manifold on Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) for first dimension isoelectric focusing (IEF). IEF protocol used is divided in five steps: 1- Step 300 V, 200 Vhr; 2- Grad 1000 V, 300 Vhr; 3-Grad 5000 V, 4500 Vhr ; 4- Step 5000V, 9000 Vhr ; 5- Step 300V, 12-15 h. Seconddimension separation is performed immediately after IEF is completed. Immobiline DryStrip gels are equilibrated (15 min at room temperature) in two SDS equilibration buffers (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH=8.8, 30 % Glycerol, 2 % SDS, 0.0002 % bromophenol blue + DTT or iodoacetamide) before SDS-PAGE. Electrophoresis was performed with lab-cast gels (1 mm, Bis-Tris 10 %) in 1X Tris-Glycine-SDS buffer (BioRad, Hercules, California, USA) at 120 V for 2h30. The 2-DE gels were stained with a G-250 Coomassie blue solution, scanned and finally digitalized using the GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad). Gel alignment,

spot detection and quantification were done using the PDQuest software (PDQuest Basic-8.0.1, BioRad). Data are the means of 4 gels from 4 different experiments.

MS analysis of the differentially expressed proteins was performed at the « Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud Ouest, France » facility, using LC-MS/MS. Enzymatic digestion was realised by 50ng Trypsin (enzyme/protein ratio: 1/50, 37°C, overnight). Supernatant was used for extraction. LC-MS/MS analysis was done using a LTQ-Orbitrap Spectrometer. Nano HPLC (Dionex RSLC UltiMate3000) was used, followed by MS (Scan range: 400-1500 m/z, fragmentation: CID, Energy of collision: 35 %, Cycle for fragmentation (TopN): Top8). Data were converted to mzXML using MS convert (ProteoWizard v 3.0.8934). Databases interrogation was performed by X!Tandem Piledriver (v2015.04.01.1) and X!Tandem Pipeline (v $3.4.2 \ll$ Elastine Durcie \gg).

Protein-Protein Interactions (PPI) analysis

PPI networks were searched using STRING 10.0 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes and Proteins, http://string-db.org/). The protein's names were used as an initial input. The search parameters were as following: all PPI prediction methods were enabled, except for High-throughput Lab Experiments; maximum of 5 interactions by node; cut-off criterion of combined score ≥ 0.9 (highest confidence permitted in STRING); Homo sapiens.

Statistics

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between experimental groups were evaluated by a two-tailed unpaired Student's t test and were considered statistically significant when p<0.05 (*); p<0.01 (**) and p<0.001 (***).

Results

F508del-CFTR triggers UPR in CFBE41o-/F508del cells

Because BiP is the main sensor and regulator of the UPR [25-28], we used it as a reporter of UPR triggering. The expression of BiP in total cell lysates of CFBE41o-/WT and CFBE41o-/F508del cells was measured by western blot (Fig. 1A, upper panel). The comparison of BiP expression between these cells expressing either Wt-CFTR or F508del-CFTR, showed that BiP was significantly overexpressed in CFBE41o-/F508del cells (Fig. 1B). Thus our results show that the UPR is activated in cells expressing F508del-CFTR, in accordance with our previous results [42]. We also assessed full length ATF6 (90kDa) expression in total cell lysates of CFBE41o-/WT or CFBE41o-/F508del cells by western blot

(Fig. 1A, middle panel). We measured its expression level in both cell types and found that full length ATF6 expression was significantly higher in cells expressing F508del-CFTR than in Wt-CFTR cells (Fig. 1B). During UPR process, ATF6 is cleaved and its active form (50kDa) is released and translocated to the nucleus. Therefore, the cleaved form of ATF6 and its translocation to the nucleus were analyzed. Cytoplasmic and nuclear fractions of Wt-CFTR and F508del-CFTR cells were prepared and ATF6 expression was measured in the nuclear fractions by western blot (Fig. 1, lower panel). We found that the expression of the cleaved form of ATF6 was significantly increased in the nucleus of cells expressing F508del-CFTR (Fig. 1B), which is another evidence of the UPR activation in F508del-CFTR cells.

Therefore, as previously described [42, 43, 46], we found that UPR is triggered in cells expressing the F508del-CFTR protein.

ATF6 inhibition represses UPR in CFBE41o-/F508del cells

UPR triggering in cells expressing F508del-CFTR being shown, we assessed the effect of an AEBSF treatment upon UPR and ATF6. First of all, we defined the best conditions to use this serine protease inhibitor AEBSF for our experiments (not shown) and performed a 1 hour pre-treatment of the cells with 300 μ M AEBSF to evaluate its effects on the UPR and ATF6. As described above, we analyzed UPR by measuring the expression of BiP and evaluated both expression and activation of ATF6.

We measured BiP expression by western blot in total cell lysates of untreated or AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR (Fig. 2A). Untreated cells showed no significant variation of BiP expression over time (Fig. 2A, upper panel). In the presence of AEBSF, a significant decrease of BiP expression was observed after 4 hours of treatment (Fig. 2A, lower panel). The comparison of BiP expression between untreated and AEBSF treated cells, for each time point, was performed. Significant decreases at the 4 and 8 hours time points in the presence of AEBSF were observed (Fig. 2B). Therefore, these results demonstrated an inhibitory effect of AEBSF upon BiP expression in UPR activated F508del-CFTR cells. AEBSF is thus a repressor of the UPR in these cells. The expression of full length ATF6 was evaluated by western blot in total cell lysates of untreated or AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR. As observed in Fig. 3A (upper panel), no significant difference of ATF6 expression over time in untreated cells was observed after 4 and 8 hours of treatment, when compared to the zero time point (Fig. 3A (lower panel) and Fig. 3B). Moreover, the comparison between untreated and AEBSF treated cells for each time point

was done and showed significant decreases after 0.5, 1 and to 2 hours and a significant increase after 8 hours in AEBSF pre-treated cells (Fig. 3B). We further estimated ATF6 activation by assessing its presence in nuclear fractions of untreated and AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR (Fig. 4). In untreated cells we detected the cleaved form of ATF6 in the nuclear fractions (Fig. 4, upper panel). These experiments showed no significant variation of ATF6 expression over time (Fig. 4B). We further studied ATF6 activation in AEBSF treated cells and we observed significant decreases at the 2 and 4 hours treatment, when compared to the zero time point (Fig. 4A (lower panel) and Fig. 4B). Finally, we performed the comparison between untreated and AEBSF treated cells for each time point and observed significant decreased expression of the 50kDa form of ATF6, from 1 to 8 hours, in the nuclear fraction of AEBSF treated cells (Fig. 4B). Thus, our results showed that AEBSF inhibits ATF6 activation in cells expressing F508del-CFTR. Since ATF6 activation is due to a cleavage by S1P, we analyzed S1P expression in cells expressing Wt-CFTR and in cells expressing F508del-CFTR (Fig. 5A). We measured basal expression of S1P in total cell lysates from both cells types by western blot (Fig. 5A, left panel). No significant difference in S1P expression in cells expressing either Wt-CFTR or F508del-CFTR was observed (Fig. 5A, right panel). S1P expression was measured by western blot in total cell lysates of untreated and AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR (Fig. 5B). Experiments performed with untreated cells showed no significant difference during time (Fig. 5B, upper panel). The cells expressing F508del-CFTR were then submitted to the AEBSF treatment. As shown in Fig. 5B, no significant variation was observed over time except for the 2 hours time point (Fig. 5B, bar graphs). Finally, the comparison of S1P expression between untreated and AEBSF treated cells for each time point showed no significant difference (Fig. 5B).

ATF6 inhibition by AEBSF partially restores the Cl channel function of F508del-CFTR

To appreciate the effect of ATF6 inhibition by AEBSF on CFTR Cl⁻ channel function we performed patch-clamp experiments, in the whole cell configuration, on untreated or AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR (Fig. 6). The used experimental conditions were previously described [75, 77]. CFTR activators and inhibitor [75, 77] were used for patch-clamp experiments and were efficient to stimulate or inhibit the CFTR Cl⁻ channel activity, respectively, showing the specificity of the recorded signals (data not shown). We first compared the CFTR's function between cells expressing Wt-CFTR and cells expressing F508del-CFTR. Corresponding I/V curves are shown in Fig. 6A. Four to six independent experiments were realized from different cell cultures and the statistical analysis showed that the mean cell CI⁻ currents in CFBE410-/WT cells (118,8±21,09 pA/pF) were significantly higher than those recorded in CFBE410-/ F508del cells (32,98±14,71 pA/pF) (Fig. 6B). Unsurprisingly, our results confirmed the altered CI⁻ channel activity of the F508del mutated CFTR in CFBE/F508del cells. Then we analysed the impact of an 8 hours AEBSF treatment on F508del-CFTR CI⁻ channel activity (Fig 6A). This time point was chosen because at this time point, all our UPR markers indicated that AEBSF inhibits UPR. Four independent experiments were performed with AEBSF treated cells expressing F508del-CFTR. A significant increase of the mean cell CI⁻ currents in AEBSF treated cells (83,42±11,51 pA/pF), compared to CF untreated cells (32,98±14,71 pA/pF) was observed (Fig. 6B). Therefore, our results showed that AEBSF induced a 2.5 fold increase of the F508del-CFTR 'S CI⁻ function, reaching the limit of significance of the Wt-CFTR CI⁻ function (118,8±21,09 pA/pF). Therefore, our results show the partial restoration of the F508del-CFTR CI⁻ function in CFBE/F508del cells treated with AEBSF and suggested that using AEBSF to inhibit the ATF6 branch of the UPR in CF cells could represent a potential treatment for CF patients expressing the F508del-CFTR mutated protein.

We found that AEBSF inhibits ER stress-induced proteolysis of ATF6 and restores the Cl⁻ channel function of F508del-CFTR. Because of the importance of these results, we assessed the effect of another S1P inhibitor. Indeed, the observed recovery of the function of F508del-CFTR could be due to AEBSF itself. We used a specific S1P inhibitor, the amino-pyrrolidine amide compound PF-429242, which efficiently blocks the S1P-mediated cleavage of ATF6 upon ER stress [78]. The effect of PF-429242 upon F508del-CFTR function was assessed using the same methodology as for AEBSF. I/V curves were drawn (Fig. 7A). It was observed that the Cl⁻ currents through F508del-CFTR were higher in PF-429242 treated cells (n=6) than in untreated cells (n=5). The statistical analysis (Fig. 7B) showed that PF-429242 treatment leads to a significant increased function of F508del-CFTR (82,67±22,26 pA/pF) and that this increased function is similar to the increase observed with AEBSF.

Cell surface expression of F508del-CFTR is increased when ATF6 is inhibited

To explain the partial restoration of the Cl⁻ channel function of F508del-CFTR when ATF6 is inhibited by AEBSF, we assessed the rescue of CFTR within cell membranes. We used BHK Chinese hamster ovary cells because they are not polarized and therefore CFTR's function can be studied independently of sophisticated trafficking and regulation [79]. Despite they are less relevant regarding CFTR biogenesis, they represent a simple model and when they are transfected they express high amounts of CFTR. This permits a more direct

characterization of a direct effect of a compound upon CFTR function. The used BHK cells did express CFTR with a 3-Haemaglutinin (HA)-epitope tag on the fourth extracellular loop [76]. The tag was recognized by an anti-HA antibody which was directly added to the culture medium and recovered by magnetic beads and detected by immunoblot. As shown in Fig. 8, the mature form of CFTR (C band, 170 kDa) was observed in the cells expressing Wt-CFTR and was absent in F508del-CFTR cells. In cells expressing F508del-CFTR, the mature form of CFTR was only observed after AEBSF treatment, indicating that ATF6 inhibition induces the glycosylation of F508del-CFTR and likely its exportation to the membrane.

Differentially expressed proteins when ATF6 is inhibited

In order to depict differentially expressed proteins after ATF6 inhibition, cell lysates of untreated and treated cells were submitted to 2-DE. 4 gels were performed with both cell types and spots were analyzed by PDQuest software (BioRad). 404 and 408 spots were detected in untreated and treated cell lysates, respectively (Fig. 9). Among spots showing variations in their expression and according to the parameters used for the detection, 4 spots were increased (above 2 fold) in untreated cells (Fig. 9, upper panel) and 4 spots were increased in cells with inhibited ATF6 (Fig. 9, lower panel). These 8 spots were further analyzed by MS. This analysis led to the identification of 6 different proteins (Table 1). HNRNPH1 and HNRH3 were found to be decreased whereas, PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 were found to be increased, after ATF6 inhibition (Table 1).

PPI networks of the differentially expressed proteins when ATF6 is inhibited

For a better description of the depicted proteins, we search for their potential interactions using the 10.0 version of STRING [80]. We used the basic interaction unit in STRING for functional association between proteins, derived from known experimental data. For HNRNPH1, HNRH3, PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 we searched for high confidence (≥ 0.9) interactions and retrieved independent graphs. Unexpectedly, we observed that the proteins shared Ubiquitin C (UBC) as a common interacting partner and we drew a global graph showing this interaction (Fig. 10). We also observed that HSP7C and HSP71 directly interact with CFTR.

Discussion

The most common genetic form of CF is due to the F508del mutation in the *CFTR* gene. This mutation leads to an incorrectly folded CFTR protein which is retained in the ER and partially degraded. This accumulation of unfolded F508del-CFTR protein in the ER

triggers the UPR adaptive response [42, 43, 52]. To cope with unfolded proteins accumulated in the ER, cells transiently diminish their translational and transcriptional activity. In parallel they activate genes encoding ER-resident chaperones such as BiP and folding enzymes, with the aim of increasing the folding capacity of the ER. The UPR transducer ATF6 and ER stress sensor BiP are widely used as UPR markers [40, 80]. ATF6 is a type II transmembrane glycoprotein anchored in the ER which is activated by proteolysis by S1P in response to ER stress [58, 69]. Indeed, its N-terminal part is then released from the membrane of the ER, is translocated to the nucleus where it activates the transcription of their target genes of the ERSE [58].

In 2007, we showed for the first time a specific involvement of ATF6 in cells expressing F508del-CFTR and we demonstrated that when ATF6 expression is decreased by siRNA, the Cl⁻ flux through F508del-CFTR are increased [42]. Therefore, the aim of the present work was to show that this effect can be achieved by the use of chemical compounds. The serine protease inhibitor 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF) was shown to inhibit the proteolysis of ATF6, leading to the inhibition of the transcriptional of ATF6target genes [69]. This inhibited ATF6 activation was further shown to be due to a direct S1P inhibition [69]. Therefore, we used AEBSF to treat cells expressing Wt-CFTR and F508del-CFTR. No obvious cell toxicity was observed in the used concentration. We assessed the effect of the compound on BiP and S1P expression, and upon ATF6 expression. We observed an effective UPR inhibition which was further correlated to an increased function of F508del-CFTR in treated cells, in link with a higher amount of the mutated protein within membranes. To further confirm this finding regarding the effect of the S1P blockage upon CFTR, we used another compound know to inhibit S1P. This compound was PF-429242 which, beside its anti-viral activity, is known to inhibit the processing of the activation of ATF6 in response to ER stress [78]. As for AEBSF, no obvious cell toxicity was observed.

Having shown that AEBSF reduced the expression of the cleaved form of ATF6 and decreases S1P expression, we tested the effect of both AEBSF and PF-429242upon F508del-CFTR's function, using whole cell patch-clamp experiments [77]. For both compounds we showed increased Cl⁻ efflux in cells expressing F508del-CFTR. This increased F508del-CFTR's function could be explained by an increased expression, an increased translocation towards the membrane, a decreased degradation by ERAD, a decreased recycling or by an increased time of presence and thus membrane localization of the channel. We did not test experimentally all these hypotheses but assessed a potential increased localization of F508del-

CFTR within membranes, after treatment. Our results showed that AEBSF and PF-429242 both increase the presence of F508del-CFTR within membranes. Indeed, the appearance after treatment of the cells, of the 170 kDa form of CFTR, which is fully glycosylated, likely indicated that the localization of the protein was increased in membranes or that its maturation was increased (or both). Nevertheless, other hypotheses were not excluded.

In order to depict the molecular action linking AEBSF to the increased Cl⁻ function of F508del-CFTR, we performed 2-DE and MS analysis of differentially expressed proteins after treatment. We found that HNRNPH1 and HNRH3 were decreased and that PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 were increased, when the cleavage of ATF6 is inhibited. We further performed a bibliographic analysis to characterise these proteins. A summary of their function and possible involvement in CF is given Table2.

From transcription in the nucleus to the cytoplasm, mRNAs associate with proteins (RNA-binding proteins). These interactions with ribonucleoproteins (RNPs) are involved in pre-mRNA processing, transport, localization, translation and stability of mRNAs. Among RNPs, heterogeneous nuclear RNPs (hnRNPs) are proteins that bind to nascent transcripts produced by RNA polymerase II (for review [82]). A specific feature of the hnRNPs is that they undergo nucleocytoplasmic shuttling and that their function involves interactions within many other proteins [82, 83]. The H family of hnRNPs includes H1 (H), H2 (H') and H3 hnRNPs which have very similar sequences and which are well known regulators of alternative splicing [84]. Due to their involvement in the regulation of gene expression, hnRNPs have been linked to numerous diseases [85]. We found here that the expression of HNRNPH1 and HNRH3 is decreased in cells when ATF6 cleavage is inhibited. Therefore, a modulation of mRNA processing and alternative splicing may occur. Knowing that posttranscriptional processing of CFTR mRNA may be modulated, leading to an in-frame skipping of exon 9 [86], HNRNPH1 and HNRH3 are possibly involved in modulation of the expression of functional mRNA of F508del-CFTR. Indeed, whereas HNRNPH1 was shown to inhibit alternative splicing in neurons [87], HNRH3 was shown to shown to enhance RNA splicing and processing [88]. HNRNPH1 and HNRH3 are therefore involved in our treated cells but in view of the bibliography it is not clear if they can explain the observed Cl⁻ channel function of F508del-CFTR when ATF6 cleavage is inhibited. They can furthermore be implicated in the maturation of many mRNAs and have an indirect implication upon CFTR maturation and membrane targeting.

PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 were increased when ATF6 cleavage was inhibited.

The protein PDIA3 (Protein disulfide-isomerase A3, Grp58) belongs to the protein disulfide isomerase family, whose members are mainly present, in the ER [89] where it exhibits a stress-responsive protein function. As such, it was identified together with GRP78 and GRP94 with an increased expression after glucose depletion [90]. The main function of PDIA3 (Grp58) is to oxidize thiols and reduce disulfide bonds of proteins, in order to reshuffle improperly formed disulfide bonds and to correct the folding of proteins within the ER [91]. As a chaperone protein [91] and together with calnexin and calreticulin, it is involved in the correct folding of glycoproteins within the ER [92]. Therefore its increased expression after ATF6 inhibition likely favours the refolding of F508del-CFTR, explaining why we found an increased function and an increased amount of the mature form of CFTR in treated cells. Furthermore, PDIA3 was shown to be present in CFTR's protein complex and up-regulated when F508del-CFTR is chemically or genetically rescued [93]. This latest point indicates that we succeeded to rescue F508del-CFTR, as shown by the present results.

HSP71 (71 kDa heat shock protein, HspA1A/ HspA1B) belongs to the 70 kDa heat shock protein (HSP70s) family. It is found in cytosol, nucleus, membranes and in extracellular exosomes. It can be induces by stress such as thermal stress, infections, inflammation and oxidants [94]. To fulfill their numerous cellular and stress-induced functions, HSP70s bind ATP [95] and act as unfolding machines able to shift polypeptides to various folding states. When exposed to stressors, HSP70s bind misfolded proteins and prevent their aggregation [96]. Indeed, they HSP70s possess an unfoldase activity since they are able to recognize misfolded and aggregated proteins and to unfold them to a natively refoldable state [97]. Among HSP70s, HspA1A and HspA1B, which only differ by two amino acids, are the major stress-inducible HSP70s [94] with a pivotal role in the protein quality control system of misfolded proteins and in their targeting to degradation [98]. Regarding CFTR, Hsp70 are of main importance. They associate with both Wt-CFTR and F508del-CFTR and dissociate from Wt-CFTR when it is transported from the ER to the Golgi [99]. F508-CFTR/Hsp70 forms a stable complex permitting the degradation of F508del-CFTR in the pre-Golgi, nonlysosomal, compartments [99]. They are therefore involved in the maturation and in the degradation of unfolded CFTR such as F508del-CFTR. We observed an increased expression of the HSP71 member of HSP70s when ATF6 is inhibited. We thus hypothesize that this increased protein expression is eliminating unfoldable F508del-CFTR

and is favouring the maturation and refolding of some reversely unfolded F508del-CFTR. The ultimate effect is likely an increased refolding, as seen in the present results.

Among HSP70s, we also observed an increased expression of HSP7C (Hsc70; constitutive) which is also known as HspA8 [96]. HspA8 is a cognate Hsp70 family with essentially folding and transport of polypeptides across intracellular membranes as main functions [96]. Interestingly, stress maintains HSPA8 in a monomeric form leading to the release of unfolded proteins previously bound to it [100]. Indeed, HSPA8 has four main functions: 1) it binds native and misfolded proteins to favor their refolding [101], 2) it transports unfolded proteins through membranes to deliver them to their final localization [102], 3) it recruits proteins for proteasome activation [103], and 4) it brings proteins to the endosomes and triggers autophagy [104]. It forms a cytosolic complex together with CHIP E3 and cooperates with the ER membrane associated ubiquitin ligase complex to favour triage of proteins [105]. HSP7C, together with Hsp70, is involved in the proper folding of CFTR [105] by direct interactions with a higher affinity for F508del-CFTR than for Both Wt-CFTR [106]. Thus, it's over expression in the present work is in favour of a greater folding and exportation of F508del-CFTR to the membrane.

GRP75 (Glucose-regulated protein 75), also called mortalin (sometimes termed GRP75/mtHSP70/PBP74), is a member of the HSP70s family [107]. Mortalin is translated in the cytoplasm and is transported into mitochondria [108]. Neverheless, it is also found in the ER endoplasmic reticulum, and in the cytosol [109]. Mortalin is a stress response protein and its increased expression is associated with cellular protection, as it permits cells to survive lethal conditions [110, 111]. It has a broad panel of functions such as stress response, intracellular trafficking, cell differentiation and proliferation (for review [112]). Because it ensures the final localization of proteins, modifies their functions, protect them against stress and is up-regulated when F508del-CFTR is rescued [93, 113, 114], its overexpression when ATF6 is inhibited likely leads to the recovery of some mutated CFTR, explaining our present results.

The protein network in which a protein takes place is a good indicator of the pathway in which it is involved. Thus, we search for interacting proteins with PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP7, using STRING which is a global resource currently covering 9,643,763 proteins. In an unexpected way, we found that all the proteins that were found modulated when ATF6 is inhibited have a common partner: ubiquitin C (UBC). This result was further confirmed by the analysis of the relevant bibliography for each interaction (HNRNPH1-UBC,

[115]; HNRH3-UBC, [116]; PDIA3 (Grp58)-UBC, [117]; HSP7C- HSP71- and GRP75-UBC, [118]). Unfolded proteins in the ER are exported into the cytosol and degraded via the ubiquitin-proteasome pathway, a process termed ER-associated degradation (ERAD). Therefore, protein ubiquitination contributes to the regulation of protein degradation. As any protein, both Wt- and F508del-CFTR undergo ubiquitination and degradation [119]. Misfolding of F508del-CFTR facilitates its lysosomal targeting by promoting its ubiquitination [120]. Therefore, if UBC is overexpressed in our model, what we do not know, it would not explain the higher amount of F508del-CFTR in cell membranes when ATF6 is inhibited. Nevertheless, the promoter of the UBC gene (UBC) contains putative heat shock elements (HSEs) which mediate UBC induction upon stress. At least three HSEs, exist in the UBC promoter: two distal, and one proximal to the transcription start site, all bound by transcription factors belonging to the heat shock factor (HSF) family. The proximal is a negative regulator of the stress-induced transcription [121]. Therefore, if a HSE with a negative role on the transcription is overexpressed, it could explain why in our hands, more F508del-CFTR is present in the membrane. It has also to be noticed that we recently showed a pivotal role of UBC as a modifier gene in CF by in silico studies [122].

Conclusion

The two isoforms of ATF6 (ATF6 α and ATF6 β), are cleaved in response to ER stress. Their resulting N-terminal fragments possess a DNA binding domains. When translocated to the nucleus, they both bind to ER stress-response elements (ERSE). Nevertheless, it was shown that ATF6 β possesses very low specific transcriptional activity when compared with ATF6 α and is likely a repressor of ATF6 α [122, 123]. In other words, the relative levels of ATF6 α and ATF6 β , lead the strength and duration of ATF6 α dependent ERSE genes induction. In the present study, the cleavage of both ATF6 isoforms was inhibited. Indeed, under ER stress, the cleavage of ATF6 α was shown to be maximal after 3 to 4 h, whereas the cleaved form of ATF6 β appears after 8 h [122].

In CF, we showed that the inhibition of the cleavage of ATF6 by S1P alleviates the defects observed in the membrane localization and Cl⁻ channel function of F508del-CFTR. According to our proteomic study, this rescue is due to the modulation of the expression of proteins implicated in mRNA maturation and splicing (HNRNPH1, HNRH3) and in the folding and the degradation of F508del-CFTR (PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71). Our results are therefore in accordance with a previous work, in which ATF6a -/- cells were

submitted to ER stress [60]. Interestingly, all the proteins we highlighted in the present work can directly interact with UBC, which was reported as a CFTR modifier gene [124].

The present work shows the implication of ATF6 in F508del-CFTR biogenesis and constitutes the first proof of concept of ATF6 inhibition as a target in CF therapy.

References

1- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245:1066-1073

2- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. (1991) Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. Science 253:202-205

3- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, Klinger KW, Smith AE, Welsh MJ. (1990) Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. Nature 347:358-363

4- Gething MJ, Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell. Nature 355:33-45

5- Araki K, Nagata K. (2012) Protein folding and quality control in the ER. Cold Spring Harb Perspect Biol 4:a015438

6- Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. (2014) Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. The Journal of cell biology 204:869-879

7- Kaufman RJ. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes & development 13:1211-1233

8- Liu CY, Kaufman RJ. (2003) The unfolded protein response. Journal of cell science 116:1861-1862

9- Mori K. (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. Cell 101:451-454

10- Ron D, Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nature reviews 8:519-529

11- Schroder M, Kaufman RJ. (2005) ER stress and the unfolded protein response. Mutation research 569:29-63

12- Casagrande R, Stern P, Diehn M, Shamu C, Osario M, Zuniga M, Brown PO, Ploegh H. (2000) Degradation of proteins from the ER of S. cerevisiae requires an intact unfolded protein response pathway. Molecular cell 5:729-735

13- Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T. (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. Nature cell biology, 2 379-384.

14- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. (2005) ERAD: the long road to destruction. Nature cell biology 7:766-772

15- Oyadomari S, Yun C, Fisher EA, Kreglinger N, Kreibich G, Oyadomari M, Harding HP, Goodman AG, Harant H, Garrison JL, Taunton J, Katze MG, Ron D. (2006) Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. Cell 126:727-739

16- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. Cell 101:249-258

17- Schroder M, Kaufman RJ. (2005) The mammalian unfolded protein response. Annual review of biochemistry 74:739-789

18- Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, Saunders T, Bonner-Weir S, Kaufman RJ. (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. Molecular cell 7:1165-1176
19- Martino ME, Olsen JC, Fulcher NB, Wolfgang MC, O'Neal WK, Ribeiro CM. (2009) Airway epithelial inflammation-induced endoplasmic reticulum Ca2+ store expansion is mediated by X-box binding protein-1. J Biol Chem 284:14904-14913

20-Ribeiro CM, O'Neal WK. (2012) Endoplasmic reticulum stress in chronic obstructive lung diseases. Current molecular medicine 12:872-882

21- van 't Wout EF, van Schadewijk A, van Boxtel R, Dalton LE, Clarke HJ, Tommassen J, Marciniak SJ, Hiemstra PS. (2015) Virulence Factors of Pseudomonas aeruginosa Induce Both the Unfolded Protein and Integrated Stress Responses in Airway Epithelial Cells. PLoS pathogens 11:e1004946

22- Celli J, Tsolis RM. (2015) Bacteria, the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: friends or foes? Nature reviews 13:71-82

23- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM. (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. J Biol Chem 277:21836-21842

24- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. The Journal of clinical investigation 115:2656-2664

25- Haas IG, Wab M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. Nature 306:387-389

26- Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ. (1997) Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. J Biol Chem 272:4327-4334

27- Munro S, Pelham HR. (1986) An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. Cell 46:291-300

28- Shiu RP, Pouyssegur J, Pastan I. (1977) Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteinsin Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 74:3840-3844

29- Kohno K. (2007) How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress. Antioxidants & redox signaling 9:2295-2303

30- Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. Molecular and cellular biology 18:7499-7509

31- Cox JS, Shamu CE, Walter P. (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. Cell 73:1197-1206

32- Zhu C, Johansen FE, Prywes R. (1997) Interaction of ATF6 and serum response factor. Molecular and cellular biology 17:4957-4966

33- Harding HP, Calfon M, Urano F, Novoa I, Ron D. (2002) Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. Annual review of cell and developmental biology 18:575-599

34- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nature cell biology 2:326-332

35- Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. (2005) Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. Molecular and cellular biology 25:921-932 36- Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. Developmental cell 3:99-111

37- Ma K, Vattem KM, Wek RC. (2002) Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. J Biol Chem 277:18728-18735

38- Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. (2000) Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. J Biol Chem 275:27013-27020

39- Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. Nature 332:462-464

40- Lee AS. (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods 35:373-381

41- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245:1073-1080

42- Kerbiriou M, Le Drevo MA, Ferec C, Trouve P. (2007) Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6. Biochim Biophys Acta 1772(11-12):1236-49

43- Bartoszewski R, Rab A, Jurkuvenaite A, Mazur M, Wakefield J, Collawn JF, Bebok Z. (2008) Activation of the Unfolded Protein Response by {Delta}F508 CFTR. Am J Respir Cell Mol Biol 39(4):448-457

44- Gomes-Alves P, Couto F, Pesquita C, Coelho AV, Penque D. (2010) Rescue of F508del-CFTR by RXR motif inactivation triggers proteome modulation associated with the unfolded protein response. Biochim Biophys Acta 1804:856-865

45- Pahl HL, Baeuerle PA. (1995) A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. The EMBO journal 14:2580-2588

46- Blohmke CJ, Mayer ML, Tang AC, Hirschfeld AF, Fjell CD, Sze MA et al. (2012) Atypical Activation of the Unfolded Protein Response in Cystic Fibrosis Airway Cells Contributes to p38 MAPK-Mediated Innate Immune Responses. J Immunol 189:5467-5475

47- Cohen-Cymberknoh M, Kerem E, Ferkol T, Elizur A. (2013) Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. Thorax 68:1157-1162

48- Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. (2012) ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? Trends in molecular medicine 18(10):589-598

49- Zhang K, Kaufman RJ. (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. Nature 454:455-462

50- Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT et al. (2006) Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. Cell 124:587-599

51- Weber AJ, Soong G, Bryan R, Saba S, Prince A. (2001) Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl- channel function. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281:L71-78

52- Rab A, Bartoszewski R, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Collawn JF, Bebok Z. (2007) Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. Am J Physiol Cell Physiol 292:C756-C766

53- Bebok Z, Collawn JF, Wakefield J, Parker W, Li Y, Varga K, Sorscher EJ, Clancy JP. (2005) Failure of cAMP agonists to activate rescued Δ F508 CFTR in CFBE410- airway epithelial monolayers. J Physiol 569:601-615

54- Chen X, Shen J, Prywes R. (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. J Biol Chem 277:13045-13052

55- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell 10:3787-3799

56- Shen J, Prywes R. (2005) ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. Methods 35:382-389

57- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R et al. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. Molecular cell 6:1355-1364

58- Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. (2004) Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. Journal of biochemistry 136:343-350

59- Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H et al. (2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. Developmental cell 13:365-376

60- Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J et al. (2007) ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. Developmental cell 13:351-364

61- Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. (2008) ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. Cell Struct Funct 33:75-89

62- Damiano F, Tocci R, Gnoni GV, Siculella L. (2015) Expression of citrate carrier gene is activated by ER stress effectors XBP1 and ATF6alpha, binding to an UPRE in its promoter. Biochim Biophys Acta 1849:23-31

63- Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. (2008) Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. Science 320:1492-1496

64- Glimcher LH. (2010) XBP1: the last two decades. Annals of the rheumatic diseases 69(1):67-71

65- Kim I, Xu W, Reed JC. (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov 7:1013-1030

66- Oyadomari S, Mori M. (2004) Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ 11:381-389

67- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. Molecular cell 5:897-904

68- Namba T, Ishihara T, Tanaka K, Hoshino T, Mizushima T. (2007) Transcriptional activation of ATF6 by endoplasmic reticulum stressors. Biochemical and biophysical research communications 355:543-548

69- Okada T., Haze K., Nadanaka S., Yoshida H., Seidah N.G., Hirano Y et al. (2003) A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. J Biol Chem 278:31024-31032

70- Bruscia E, Sangiuolo F, Sinibaldi P, Goncz KK, Novelli G, Gruenert DC. (2002) Isolation of CF cell lines corrected at DeltaF508-CFTR locus by SFHR-mediated targeting. Gene Ther 9:683-685

71- Kunzelmann K, Schwiebert EM, Zeitlin PL, Kuo WL, Stanton BA, Gruenert DC. (1993) An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. Am J Respir Cell Mol Biol 8:522-529 72- Illek B, Maurisse R, Wahler L, Kunzelmann K, Fischer H, Gruenert DC. (2008) Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates with CFTR mRNA expression levels. Cell Physiol Biochem 22:57-68

73- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275

74- Farre C, Stoelzle S, Haarmann C, George M, Bruggemann A, Fertig N. (2007) Automated ion channel screening: patch clamping made easy. Expert opinion on therapeutic targets 11:557-565

75- Benz N., Le Hir S., Norez C., Kerbiriou M., Calvez M.L., Becq F et al. (2014) Improvement of chloride transport defect by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cystic fibrosis epithelial cells. PLoS ONE 9:e88964

76- Carlile GW, Robert R, Zhang D, Teske KA, Luo Y, Hanrahan JW et al. (2007) Correctors of protein trafficking defects identified by a novel high-throughput screening assay. ChemBioChem 8:1012-1020

77- Huguet F, Calvez ML, Benz N, Le Hir S, Mignen O, Buscaglia P et al. (2016) Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR. Cellular and Molecular Life Sciences 73 (17):3351-3373

78- Pasquatoa A, Rochata C, Burria DJ, Pasquala G, de la Torreb JC, Kunza S. (2012) Evaluation of the anti-arenaviral activity of the subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease inhibitor PF-429242. Virology 423:14-22

79- Farinha CM, Sousa M, Canato S, Schmidt A, Amaral MD. (2015) Increased efficacy of VX-809 in different cellular systems results from an early stabilization effect of F508del-CFTR. Pharmacol Res Perspect (4):e00152

80- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J et al. (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res 43:D447-452

81- Shang J. (2005) Quantitative measurement of events in the mammalian unfolded protein response. Methods 35:390-394

82- Han SP, Tang YH, Smith R. (2010) Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. Biochemical Journal 430(3):379-392

83- Pinol-Roma S, Dreyfuss G. (1992) Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. Nature 355:730-732

84- Martinez-Contreras R, Fisette JF, Nasim FH, Madden R, Cordeau M, Chabot B. (2006) Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing. PLoS Biol 4:172-185

85- Carpenter B, MacKay C, Alnabulsi A, MacKay M, Telfer C, Melvin WT et al. (2006) The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. Biochim Biophys Acta 1765:85-100

86- Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. Nature Genet 3:151-156

87- Grammatikakis I, Zhang P, Panda AC, Kim J, Maudsley S, Abdelmohsen K et al. (2016) Alternative splicing of neuronal differentiation factor TRF2 regulated by HNRNPH1/H2. Cell Rep 15:926-934

88- Mahé D, Mähl P, Gattoni R, Fischer N, Mattei MG, Stévenin J et al. (1997) Cloning of Human 2H9 Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins. The Journal of Biological Chemistry 272:1827-1836

89- Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. J Cell Physiol 193:154-163

90- Lee AS. (1981) The accumulation of three specific proteins related to glucoseregulated proteins in a temperature-sensitive hamster mutant cell line K12. J Cell Physiol 106:119-125 91- Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. (1994) Protein disulphide isomerase: building bridges

in protein folding. Trends Biochem Sci 19:331-336

92- Elliott JG, Oliver JD, High S. (1997) The thiol-dependent reductase ERp57 interacts specifically with N-glycosylated integral membrane proteins. J Biol Chem 272:13849-13855 93- Singh OV, Pollard HB, Zeitlin PL. (2008) Chemical Rescue of Δ F508-CFTR Mimics Genetic Repair in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. Mol Cell Proteomics 7(6):1099-1110

94- Lindquist S, Craig EA. (1988) The heat-shock proteins. Annu Rev Genet 22:631-677

95- De Los R., Goloubinoff P. (2016) Hsp70 chaperones use ATP to remodel native protein oligomers and stable aggregates by entropic pulling. Nat Struct Mol Biol 23:766-769

96- Radons J. (2016) The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? Cell Stress Chaperones 21:379-404

97- Sharma SK, De Los RP, Christen P, Lustig A, Goloubinoff P. (2010) The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. Nat Chem Biol 6:914-920

98- Carra S, Alberti S, Arrigo PA, Benesch JL, Benjamin IJ, Boelens W et al. (2017) The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions. Cell Stress and Chaperones doi:10.1007/s12192-017-0787-8

99- Yang Y, Janich S, Cohn JA, Wilson J. (1993) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. Proc Natl Acad Sci USA 90:9480-9484

100- Zuiderweg ER, Hightower LE, Gestwicki JE. (2017) The remarkable multivalency of the Hsp70 chaperones. Cell Stress Chaperones 22:173-189

101- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. Nat Rev Mol Cell Biol 5:781-791

102- Hohfeld J, Hartl FU. (1994) Post-translational protein import and folding. Curr Opin Cell Biol 6:499-509

103- Demand J, Luders J, Hohfeld J. (1998) The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. Mol Cell Biol 18:2023-2028

104- Majeski AE, Dice JF. (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. Int J Biochem Cell Biol 36:2435-2444

105- Younger JM, Ren HY, Chen L, Fan CY, Fields ., Patterson C et al. (2004) A foldable CFTR {Delta}F508 biogenic intermediate accumulates upon inhibition of the Hsc70-CHIP E3 ubiquitin ligase. J Cell Biol 167:1075-1085

106- Amaral MD. (2004) CFTR and chaperones: processing and degradation. J Mol Neurosci 23:41-48

107- Webster TJ, Naylor DJ, Hartman DJ, Hoj PB, Hoogenraad NJ. (1994) cDNA cloning and efficient mitochondrial import of pre-mtHSP70 from rat liver. DNA Cell Biol 13:1213-1220

108- Wadhwa R, Taira K, Kaul SC. (2002) An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: What, when, and where? Cell Stress Chaperones 581:3702-3710

109- Ran Q, Wadhwa R, Kawai R, Kaul SC, Sifers RN, Bick RJ et al. (2000) Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. Biochem Biophys Res Commun 275:174-179

110- Qu M, Zhou Z, Xu S, Chen C, Yu Z, Wang D. (2011) Mortalin overexpression attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. Brain Res 1368:336-345

111- Xu L, Voloboueva LA, Ouyang Y, Emery JF, Giffard RG. (2009) Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 in rat brain protects mitochondria, reduces oxidative stress, and protects from focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 29:365-374

112- Dores-Silva PR, Barbosa LRS, Ramos CH, Borges JC. (2015) Human Mitochondrial Hsp70 (Mortalin): Shedding Light on ATPase Activity, Interaction with Adenosine Nucleotides, Solution Structure and Domain Organization. PLoS One 10(1):e0117170

113- Taurin S, Seyrantepe V, Orlov SN, Tremblay TL, Thibault P, Bennett MR et al. (2002) Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of $[Na^+]_i/[K^+]_i$ ratio in cultured vascular smooth muscle cells. Circ Res 91:915-922

114- Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R. (2007) Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer. Experimental Gerontology 42:263-274

115- Lopitz-Otsoa F, Rodriguez-Suarez E, Aillet F, Casado-Vela J, Lang V, Matthiesen R et al. (2012) Integrative analysis of the ubiquitin proteome isolated using Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs). J Proteomics 75(10):2998-3014

116- Danielsen JM, Sylvestersen KB, Bekker-Jensen S, Szklarczyk D, Poulsen JW, Horn H et al. (2011) Mass spectrometric analysis of lysine ubiquitylation reveals promiscuity at site level. Mol Cell Proteomics 10(3):M110.003590

117- Gururaja T, Li W, Noble WS, Payan DG, Anderson DC. (2003) Multiple functional categories of proteins identified in an in vitro cellular ubiquitin affinity extract using shotgun peptide sequencing. J Proteome Res 2(4):394-404

118- Xiao K, McClatchy DB, Shukla AK, Zhao Y, Chen M, Shenoy SK et al. (2007) Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. Proc Natl Acad Sci USA 104(29):12011-12016

119- Ward CL, Omura S, Kopito RR. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitinproteasome pathway. Cell 83(1):121-127

120- Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K et al. (2004) Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. J Cell Biol 164(6) :923-933

121- Crinelli R, Bianchi M, Radici L, Carloni E, Giacomini E, Magnani M. (2015) Molecular Dissection of the Human Ubiquitin C Promoter Reveals Heat Shock Element Architectures with Activating and Repressive Functions. PLoS One 10(8):e0136882

122- Thuerauf DJ, Morrison L, Glembotski CC. (2004) Opposing Roles for ATF6 α and ATF6 β in Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Induction. The Journal of Biological Chemistry 279(20):21078-21084

123- Thuerauf DJ, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. (2007) Effects of the Isoformspecific Characteristics of ATF6 α and ATF6 β on Endoplasmic Reticulum Stress Response Gene Expression and Cell Viability. The Journal of Biological Chemistry 282:22865-22878

124- Trouvé P, Génin E, Férec C. (2016) In silico search for modifier genes associated with Pancreatic and Liver Disease in Cystic Fibrosis. PLoSONE 12(3):e0173822

Legends to the figures.

Figure 1. The UPR is triggered in CFBE41o-/F508del cells. A. Representative immunodetection experiments of the BiP (78 kDa, top gel), ATF6 90 kDa (middle gel) and cleaved ATF6 (50 kDa, bottom gel) proteins in CFBE41o- cells overexpressing either CFTR-WT or the F508del-CFTR. **B.** Statistical analysis of BiP (left, n = 6), ATF6 90 kDa (middle, n = 6) and ATF6 50 kDa (right, n = 5) expression in CFBE41o-/WT and in CFBE41o-/F508del cells. A significant increased expression of BiP and ATF6 (90 and 50 kDa) was observed in the cells expressing the mutated CFTR.

Figure 2. BiP expression is decreased by AEBSF in CFBE41o-/F508del cells. A. The upper image is a representative gel showing BiP expression in untreated cells (n = 4). The lower image shows a western blot analysis of the expression of BiP in AEBSF treated cells (300 μ M, n = 3 to 5) at different time points (0; 0.5; 1; 2; 4 or 8 hours). B. Bar graphs represent the quantification of BiP expression under AEBSF treatment. A significant decreased expression of BiP was observed for the 4h and 8h time points.

Figure 3. The uncleaved form of ATF6 (90kDa) is decreased by AEBSF in CFBE41o-/F508del cells. A. The upper image is a representative gel showing ATF6 expression in untreated cells (n = 4). The lower image shows a western blot analysis of the expression of ATF6 in AEBSF treated cells (300μ M, n = 3 to 5) at different time points (0; 0.5; 1; 2; 4 or 8 hours). B. Bar graphs represent the quantification of ATF6 expression under AEBSF treatment. A decreased expression was observed for the 0.5, 1 and 2 hours time points, whereas the expression was increased for the 4 and 8 hours time points.

Figure 4. The active form of ATF6 (50kDa) is decreased by AEBSF in CFBE41o-/F508del cells. A. The upper image is a representative gel showing the expression of the active form of ATF6 in untreated cells (n = 4). The lower image shows a western blot analysis of the expression of the active form of ATF6 in AEBSF treated cells (300μ M, n = 3 to 5) at different time points (0; 0.5; 1; 2; 4 or 8 hours). B. Bar graphs represent the quantification of the cleaved ATF6 expression under AEBSF treatment. A significant decreased expression of this ATF6 form was observed for the 1, 2, 4 and 8 hours time points.

Figure 5. Expression of S1P in cells expressing Wt- and F508del-CFTR cells, with and without AEBSF treatment. A. The left image shows a representative immunodetection experiment of the S1P protein (110 kDa) in cells expressing either Wt- or F508del-CFTR. The right image shows the corresponding statistical analysis of S1P expression (n = 6). No significant difference was observed between the two cell lines. **B.** The upper image is a representative gel showing S1P expression in untreated cells (n = 3). The middle image is a representative gel showing S1P expression in AEBSF treated cells (300 μ M) at different time points (0.5; 1; 2; 4 or 8 hours; n = 4 to 5). The bottom image is the statistical analysis of S1P expression tended to be decreased in treated cells after 0.5 hour treatment, significance was only observed at the 2 hours time point.

Figure 6. F508del-CFTR CI⁻ channel activity is partially restored by AEBSF in cells expressing F508del-CFTR. A. The top image shows a representative current-voltage (I-V) relationships for CFTR channels in Wt-CFTR (light grey), F508del-CFTR (dark grey) and in AEBSF treated F508del-CFTR cells (300 μ M, 48 hours). B. The bar graphs show the statistical analysis of CFTR function in Wt-CFTR cells (n = 5), in F508del-CFTR cells (n = 6) and in treated F508del-CFTR cells (300 μ M AEBSF, 48 hours, n = 4). The analysis was performed using pA/pF values at +80mV. As expected, Cl⁻ currents were significantly lower in cells expressing F508del-CFTR than in cells expressing Wt-CFTR. Despite Cl⁻ currents were significantly lower in treated F508del-CFTR cells than in cells expressing Wt-CFTR, an important and significant increase (+153%) was observed in treated F508del-CFTR cells when compared to untreated cells expressing F508del-CFTR.

Figure 7. F508del-CFTR CI⁻ channel activity is partially restored by PF-429242 in cells expressing F508del-CFTR. A. The top image shows a representative current-voltage (I-V) relationships for CFTR channels in Wt-CFTR (light grey), F508del-CFTR (dark grey) and in PF-429242 treated F508del-CFTR cells (10 μ M, 48 hours). B. The bar graphs show the statistical analysis of CFTR function in Wt-CFTR cells (n = 5), in F508del-CFTR cells (n = 6) and in treated F508del-CFTR cells (10 μ M PF-429242, 48 hours, n = 5). The analysis was performed using pA/pF values at +80mV. As expected, CI⁻ currents were significantly lower in cells expressing Wt-CFTR. Despite CI⁻ currents were significantly lower in treated F508del-CFTR cells than in cells expressing Wt-CFTR, an important and significant increase (+152%) was observed in treated F508del-CFTR cells were fully comparable to those obtained with AEBSF, as shown in Fig. 6.

Figure 8. Detection of F508del-CFTR within membranes before and after AEBSF treatment. WT-CFTR or F508del-CFTR with a 3-Haemaglutinin (HA)-epitope tag present within cell membranes were detected with an anti-HA antibody, selected by protein G magnetic beads, probed with a anti-HA antibody and revealed by a HRP conjugated antibody. The image shows and example of resulting detection with the following samples: 1, control (cells expressing Wt-CFTR which were not incubated with anti-HA antibody; 3, cells expressing F508del-CFTR which were incubated with anti-HA antibody; 4, cells expressing F508del-CFTR which were not incubated with anti-HA antibody; 48 hours) treated cells expressing F508del-CFTR which were incubated with anti-HA antibody; 6, supernatant of the protein G magnetic beads. No CFTR detection was detected in the negative control lane (1). The mature form of CFTR (C band) was observed in cells expressing Wt-CFTR cells. In the presence of anti-HA antibody whereas it was absence in F508del-CFTR cells. In the F508del-CFTR, the mature form of CFTR, likely representing the CFTR within membrane, was only observed after AEBSF treatment (lane 5).

Figure 9. Example of 2-DE gels. 2-DE gels were performed in order to detect differentially expressed protein before and after AEBSF treatment (48 hours). 4 gels (pH 3-10) were performed with both treated and untreated cells and spots were further analyzed by PDQuest software (BioRad). 4 spots were increased in controls (upper panel) and 4 spots were increased in treated cells (lower panel). These spots were further analyzed by MS.

Figure 10. PPI networks of the differentially expressed proteins when ATF6 is inhibited or not. The recent 10.0 version of STRING (High confidence ≥ 0.9) was used. Graphs for HNRNPH1, HNRH3, PDIA3 (Grp58), HSP7C, GRP75 and HSP71 were retrieved and were observed that all these proteins share a common interaction protein. Therefore, we gathered the graphs and drew a single graph showing that Ubiquitin C (UBC) is a common interaction protein for our differentially expressed proteins when ATF6 is inhibited. Colored nodes are query proteins (red) and first shell of interactors. It can be noticed that HSP7C and HSP71, as well as UBC do directly interact with CFTR. Edges represent experimentally determined PPI (pink). Blue edges represent protein homologies.

Figure 11. Schematic representation of the impact of the inhibition of the cleavage of ATF6 in cells expressing F508del-CFTR. Black arrows show the normal processing of F508del-CFTR and normal ubiquitination process. Red arrows show the positive effects of the inhibition of the cleavage of ATF6 upon F508del-CFTR, according with the known effects of each protein which were highlighted in the present work. Red dashed lines indicate the possible side effects of Hsc70 and Hsp70.

| Spot | Accession number UniProtKB | Description | MW | Pi | Coverage % | log(E value) | Number of spectra for protein identification |
|------|----------------------------------|--|------|------|---------------|--------------|---|
| 1 | P31943 | HNRNPH1_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein | 49,1 | 5.89 | 38 | -102,2701645 | 66 |
| 2 | P31942-2 | HNRH3_HUMAN Isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 | 35,1 | 6.36 | 28 | -48,68246078 | 22 |
| 3 | P30101 | PDIA3_HUMAN Protein disulfide- isomerase A3 | 56,7 | 5.98 | 45 | -172,0068665 | 37 |
| 4 | P11142 | HSP7C_HUMAN Heat shock cognate 71 kDa protein (HspA8) | 70,8 | 5.87 | 37 | -132,8794556 | 51 |
| 5 | P38646 | GRP75_HUMAN Stress-70 protein | 73,5 | 5.87 | 18 | -58,63391113 | 16 |
| 6 | P0DMV8 (New nomenclature) | HSP71_HUMAN Heat shock 70 kDa protein HspA1A/ HspA1B | 69,9 | 5.47 | 29 | -126,2914658 | 39 |

Table 1. Spots identification by MS.

| Protein | Behaviour when ATF6 is inhibited | Protein function | Involvement in CF | |
|-------------------------------|--|---|---|--|
| HNRNPH1 | Decreased | HNRNPH1 belongs to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) complexes and mediates pre-mRNA alternative splicing regulation. It inhibits alternative splicing in neurons [88]. | Involved in the modulation of post-transcriptional processing of CFTR mRNA transcripts [86]. | |
| HNRH3 | Decreased | Ribonucleoprotein are responsible for RNA splicing and processing [88]. | Involved in the modulation of post-transcriptional processing of CFTR mRNA transcripts [86]. | |
| PDIA3 (Grp58) | Increased | PDIA3 is a member of the protein disulfide isomerase family mainly present in the ER. It is a chaperone and a disulfide-reshuffling enzyme [91]. Together with calnexin and calreticulin, it is involved in the correct folding of glycoproteins within the ER [92]. | Glucose-regulated protein 58 kDa/PDIA3 is present in CFTR's complex and is up-regulated when F508del-CFTR is chemically or genetically rescued [93]. | |
| HSP7C (HspA8) | HSP7C HspA8) Increased Hsc70 forms a cytosolic complex with CHI E3 and cooperates with the ER membran associated ubiquitin ligase complex to favou triage of proteins [105]. | | Heat shock cognate 70 (Hsc70), together with Hsp70, is involved in the folding of CFTR [105]. Both Wt- and F508del-CFTR bind to Hsc70 but F508del increases the affinity of CFTR [106]. | |
| GRP75 | Increased | Involved in stress response, intracellular trafficking and cell differentiation and proliferation [114]. | GRP75 is up-regulated when F508del-CFTR is chemically or genetically rescued [93]. | |
| HSP71 (HspA1A) (HspA1B) | Increased | Protects the proteome from stress. Involved in the folding and transport of polypeptides, the activation of proteolysis of misfolded proteins. Has a pivotal role in the protein quality control system of misfolded proteins and in their targeting to degradation [98]. Possesses ATPase activity [95]. | Hsp70 associates with both Wt- CFTR and F508del-CFTR. It dissociates from Wt-CFTR when it is transported from the ER to the Golgi. F508- CFTR/Hsp70 forms a stable complex permitting the degradation of F508del-CFTR in the pre-Golgi, nonlysosomal, compartments [99]. | |

Table 2. Summary of the highlighted protein analysis.



B























B



Figure 8











II. Partie 2 : Le magnésium dans la mucoviscidose

Introduction

Plusieurs études ont montré que le Mg^{2+} est impliqué dans l'expression et la fonction du CFTR. Il apparaît que la régulation de ce cation divalent doit être optimale dans des cellules exprimant le CFTR. Nous avons par conséquent émis l'hypothèse que la $[Mg^{2+}]_i$ pouvait être dérégulée dans la mucoviscidose et être à l'origine de certaines altérations rencontrées dans des cellules exprimant un CFTR muté.

Afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse, le premier objectif de cette étude était de mesurer, et ce, pour la première fois, la $[Mg^{2+}]_i$ de cellules exprimant soit un CFTR-WT, un CFTR absent de la membrane (CFTR-F508del) ou un CFTR présent à la membrane mais non fonctionnel (CFTR-G551D).

A la suite de cette mesure, si des différences de $[Mg^{2^+}]_i$ se présentaient, le but de l'étude était d'une part de déterminer l'origine de telles différences et d'autre part de savoir si la modulation de la $[Mg^{2^+}]_i$ pouvait avoir un impact sur la fonction du CFTR.

Résultats

Afin d'atteindre nos objectifs, nous avons mesuré, grâce à une sonde magnésique, la $[Mg^{2+}]_i$ dans des cellules HeLa non-transfectées (NT) ou transfectées de manière stable avec un plasmide codant un CFTR-WT, F508del ou G551D. Les résultats obtenus ont montré que la $[Mg^{2+}]_i$ était significativement plus basse dans les HeLa-NT, F508del et G551D en comparaison des HeLa-WT.

Nous avons voulu connaître l'origine de ces différences et avons donc mesuré par Western blot l'expression de TRPM7, le principal régulateur de la $[Mg^{2+}]_i$. TRPM7 est plus exprimé dans les HeLa-NT et les deux mutants du CFTR, sans que ce soit dû à une différence d'expression de son ARNm que nous avons mesuré par PCR quantitative. Si la $[Mg^{2+}]_i$ est moins élevée dans les mutants mais que l'expression de TRPM7 est supérieure, nous avons émis l'hypothèse que la fonction de TRPM7 dans ces cellules pourrait être altérée. Nous avons confirmé cette hypothèse par mesure des courants TRPM7 par *whole patch-clamp*, nettement inférieurs dans les mutants en comparaison des HeLa-WT. Afin de confirmer la mesure des courants associés à TRPM7, nous avons ajouté du Mg²⁺ dans le milieu intracellulaire. TRPM7 est en effet inhibé par une $[Mg^{2+}]_i$ élevée et nous avons pu l'observer. Nous avons par la suite cherché à savoir s'il existait une relation fonctionnelle entre TRPM7 et le CFTR. Pour cela, nous avons activé TRPM7 par du Naltriben et avons procédé aux mesures de courant Cl⁻ liés au CFTR dans les HeLa-WT et mutantes. L'activation de TRPM7 a montré une inhibition des courants liés au CFTR-WT et F508del. En revanche, une augmentation de plus de 800 % des courants Cl⁻ a été mesuré dans des HeLa-G551 à la suite de l'activation de TRPM7.

Discussion

Ces résultats montrent pour la première fois que la $[Mg^{2^+}]_i$ n'est pas la même chez tous les mutants du CFTR, au même titre que l'expression et l'activité de TRPM7.

Ces résultats permettent également de voir qu'il existe une interaction fonctionnelle entre TRPM7 et le CFTR.

D'autres investigations seront nécessaires afin d'obtenir de plus amples informations mais il semblerait que des composés tels que le Naltriben permettant l'activation de TRPM7 puissent agir en tant que potentiateurs du CFTR, ouvrant la voie vers de nouvelles pistes thérapeutiques dans la lutte contre la mucoviscidose.

ORIGINAL ARTICLE



Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR

F. Huguet^{1,2} · M. L. Calvez^{1,2,3} · N. Benz^{1,3} · S. Le Hir^{1,4} · O. Mignen^{1,2} · P. Buscaglia^{1,2} ·
F. D. Horgen⁵ · C. Férec^{1,2,4,6} · M. Kerbiriou^{1,2} · P. Trouvé¹

Received: 8 June 2015/Revised: 14 January 2016/Accepted: 25 January 2016/Published online: 13 February 2016 © Springer International Publishing 2016

Abstract Cystic fibrosis (CF), one of the most common fatal hereditary disorders, is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. The CFTR gene product is a multidomain adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) protein that functions as a chloride (Cl⁻) channel that is regulated by intracellular magnesium $[Mg^{2+}]_i$. The most common mutations in *CFTR* are a deletion of a phenylalanine residue at position 508 (Δ F508-CFTR, 70–80 % of CF phenotypes) and a Gly551Asp substitution (G551D-CFTR, 4–5 % of alleles), which lead to decreased or almost abolished Cl⁻ channel function, respectively. Magnesium ions have to be finely regulated within cells for optimal expression and function of CFTR. Therefore, the melastatin-like transient receptor potential cation channel,

F. Huguet and M. L. Calvez participated to the same extend to the present work.

- C. Férec claude.ferec@univ-brest.fr
- P. Trouvé pascal.trouve@univ-brest.fr
- ¹ Inserm, UMR1078, 46, rue Félix le Dantec, CS 51819, 29218 Brest Cedex 2, France
- ² Faculté de Médecine et des sciences de la santé, Université de Bretagne Occidentale, Brest 29200, France
- ³ Association G. Saleun, Brest 29218, France
- ⁴ Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hôpital Morvan, C.H.U. Brest, Brest 29200, France
- ⁵ Laboratory of Marine Biological Chemistry, Department of Natural Sciences, Hawaii Pacific University, Kaneohe, HI 96744, USA
- ⁶ Etablissement Français du Sang Bretagne, Brest 29200, France

subfamily M, member 7 (TRPM7), which is responsible for Mg^{2+} entry, was studies and $[Mg^{2+}]_i$ measured in cells stably expressing wildtype CFTR, and two mutant proteins (Δ F508-CFTR and G551D-CFTR). This study shows for the first time that $[Mg^{2+}]_i$ is decreased in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR mutated proteins. It was also observed that the expression of the TRPM7 protein is increased; however, membrane localization was altered for both Δ F508del-CFTR and G551D-CFTR. Furthermore, both the function and regulation of the TRPM7 channel regarding Mg²⁺ is decreased in the cells expressing the mutated CFTR. Ca²⁺ influx via TRPM7 were also modified in cells expressing a mutated CFTR. Therefore, there appears to be a direct involvement of TRPM7 in CF physiopathology. Finally, we propose that the TRPM7 activator Naltriben is a new potentiator for G551D-CFTR as the function of this mutant increases upon activation of TRPM7 by Naltriben.

Introduction

Cystic fibrosis (CF), one of the most common fatal hereditary disorders in Caucasians, is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene on chromosome 7 [1–3]. Translation of CFTR mRNA results is a 1480 residue with a predicted molecular mass of 168 kilodaltons (kDa) [2]. CFTR is a multidomain adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) protein responsible for the regulation of chloride (Cl⁻) transmembrane transport, as well as many other ions such as halides (permeation sequence $P_{\rm I} > P_{\rm Br} > P_{\rm Cl} > P_{\rm F}$; [4]) and polyatomic anions

🖄 Springer

[5], and also to some small uncharged molecules [6]. Also, CFTR function is critical in maintaining fluid homeostasis, airway fluid clearance and airway submucosal glands secretion [7, 8].

The most common mutation causing CF is a deletion of a phenylalanine residue at position 508 (Δ F508-CFTR), which is responsible for 70–80 % of CF phenotypes worldwide [8–10]. The Δ F508-CFTR protein is misfolded, retained in the endoplasmic reticulum (ER) and prematurely degraded. The limited amount of Δ F508-CFTR protein that reaches the plasma membrane is unstable, resulting in a rapid redirection from endosomal recycling towards lysosomal delivery and degradation [11–13]. Another mutation, Gly551Asp (G551D) also called "the Celtic mutation", accounts for 4–5 % of alleles, and exhibits normal protein expression and cell surface localization. Nevertheless, it is associated with a severe form of CF pathology as Cl⁻ channel function is lacking [14–17].

Under normal conditions, wildtype CFTR (WT-CFTR) is a Cl⁻ channel activated by protein kinases A and C (PKA and PKC) and deactivated by dephosphorylation by a high number of protein phosphatases [15, 16]. WT-CFTR is also regulated by protein-protein interactions involving synaptosomal-associated protein 23 (SNAP23) and syntaxin 1A, Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (NHERF), CFTR-associated protein of 70 kDa (CAP70), CFTR-associated ligand (CAL) and annexin A5 [20-28]. CFTR is also regulated by divalent cations, the most studied being calcium (Ca2+) ions. Indeed, it was clearly reported that Ca²⁺ homeostasis is altered in CF [29]. An abnormal spatial diffusion of Ca²⁺ in airway epithelial cells derived from CF patients with the Δ F508-CFTR mutation was observed, due to an accumulation of inositol 1,4,5trisphosphate (IP3) in the ER [30] and to dysfunction Ca^{2+} uptake in mitochondria [31]. An increased Ca^{2+} uptake is a hallmark of CF [32], but when the function of CFTR is restored, for example using Miglustat, Ca²⁺ homeostasis is normalized [33]. Intracellular magnesium ($[Mg^{2+}]_i$) is also important for the regulation of CFTR. The use of ionophore A23187 or ionomycine in human bronchial cells increases $[Mg^{2+}]_{i}$ and leads to a time- and dose-dependent decrease in the expression of CFTR mRNA [34]. By contrast, decreased $[Mg^{2+}]_i$ leads to reduced opening and closing rates of the CFTR channel [34]. In fact, $[Mg^{2+}]_i$ controls the closing rate of CFTR, likely in conjuction with ATP. It is well established that ATP hydrolysis by nucleotide binding domain 2 (NBD2) of CFTR is decreased when $[Mg^{2+}]_i$ is also decreased [35], the role of Mg-ATP upon CFTR's function being more efficient than that of ATP alone [36].

Due to the fact that Mg^{2+} has to be finely regulated within cells for optimal CFTR expression and function, our aim was to study the melastatin-like transient receptor

Deringer

potential cation channel, subfamily M, member 7 (TRPM7) in non-transfected Hela cells (NT) and in cells expressing WT-CFTR, ΔF508-CFTR and G551D-CFTR. TRPM7, which is a member of the melastatin-like transient receptor potential cation channel, subfamily M (TRPM) family, is ubiquitously expressed and possesses both an ion pore channel and a functional serine/threonine α-kinase domain to provide cellular influx for Ca2+, Mg2+ and divalent metals [37-40]. Being a channel and having an enzymatic activity, TRPM7 is often called chanzyme. The TRPM7 protein, which is the main cellular regulator of $[Mg^{2+}]_i$ [41], is slightly more permeable to Mg^{2+} than to Ca^{2+} and is regulated by Mg²⁺ or Mg-ATP [38, 42-44]. Indeed, TRPM7 has the following selectivity profile for divalent cations: $Zn^{2+} \approx Ni^{2+} > Ba^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} \ge Mn^{2+}$ \geq Sr²⁺ \geq Cd²⁺ \geq Ca²⁺ [43]. A remarkable finding being that trace divalent metal ions are significantly more permeable through TRPM7 than the dominant physiological divalent metal ions Ca^{2+} and Mg^{2+} [43]. Therefore, we studied the expression, the function and the channel regulation of TRPM7 by [Mg²⁺]_i in NT cells and in cells expressing WT-CFTR or mutated CFTR (Δ F508-CFTR and G551D-CFTR). The function of CFTR was further studied when TRPM7 function was modulated by specific drugs.

We show for the first time that $[Mg^{2+}]_i$ is decreased in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR. The protein expression of TRPM7 was increased in these cells whereas its function and Mg²⁺ regulation were decreased. In order to highlight a possible functional link between TRPM7 and CFTR, TRPM7 activity was increased in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR by the use of Naltriben and the function of CFTR was studied. We found that the activation of TRPM7 resulted in a decreased CFTR function in Δ F508-CFTR cells and in a highly increased function in cells expressing G551D-CFTR. Mg²⁺ and Ca²⁺ flux through TRPM7 were found to be modulated in cells expressing mutated CFTR. We conclude that the link between TRPM7 and CFTR varies with the type of CFTR mutation. Finally, we propose that Naltriben is a new potentiator of G551D-CFTR with potential implications for CF therapy. Indeed, the TRPM7 activator Naltriben rescues the altered function associated with the G551D-CFTR mutation.

Materials and methods

Cell culture, quantitative PCR and western blotting

HeLa cells stably expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR and G551D-CFTR were obtained by lentiviral infection in which the cDNA encoding the human wildtype CFTR (WT-CFTR, Transgene SA, pTG5985, France, access

Genbank No. M28668) was used, before and after site directed mutagenesis. Hela cells stably expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR or G551D-CFTR were characterized previously [45]. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; E Healthcare, USA) plus 10 % calf serum in the presence of blasticidine (2 µg/ml).

Total RNA was extracted from cells using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, France), according to the manufacturer's instructions, and the quality was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, France). RNA was further quantified using a nanophotometer for further use in Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). RT-PCR was performed using Superscript II (InVitrogen, France). Quantitative PCR was performed using a Quantitect SYBR Green kit (Qiagen, France) and 3 µg of cDNA as tempate. TRPM7 primers were used as following: forward—CTTATGAAGAGGCAGGTCATGG and reverse-CATCTTGTCTGAAGGACTG. Actin primers were forward-GCATGGAGTCCTGTGGCATCC and reverse-GAGGCCAGGATGGAGCCG. Primers were tested for efficiency (E) using a standard curve analysis. E values were 107.83 and 105.32 % ($R^2 > 0.98$) for TRPM7 and actin, respectively. Optimal annealing temperature for the qPCR assay was determined by testing a range of temperatures above and below the calculated Tm (54 °C) of the primers. PCRs yielded 213 and 238 bp amplicons for TRPM7 and actin, respectively [46]. Reactions for TRPM7 were carried out with the following parameters: initial denaturation at 95 °C for 15 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 54 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. Relative quantification of the transcripts were assessed in a one-step format (300 ng total RNA) using a QuantiTect® $\ensuremath{\mathsf{SYBR}}^{\ensuremath{\$}}$ Green RT-PCR Kit (Qiagen) with an ABI $\ensuremath{\mathsf{PRISM}}^{\ensuremath{\texttt{®}}}$ 7700 sequence detection system.

The cells were lyzed in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 % SDS, in the presence of 1.1 µM leupeptin, 0.7 µM aprotinin, 120 µM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 1 µM iodoacetamide, 0.7 µM pepstatin and 1 mM diisopropyl phosphorofluoridate (DIFP). Protein concentrations were determined using Lowry's methodology with bovine serum albumin as a standard [47]. Equal amounts of total protein for each sample (50 µg) were subjected to 4-12 % gradient SDS/PAGE (InVitrogen, France). After blotting, the polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were incubated with anti-TRPM7 (1/1000; Abcam, France, [48]) or anti-Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH, 1/7000) antibodies and with secondary antibody (anti-mouse, abcam ab6820, 1/20,000). Visualization was performed using an ECL + detection kit (Amersham, France). Densitometric analysis of the signals was performed using a GelDoc 2000 apparatus (Bio-Rad, France) and each value was normalized to the total amount of

loaded proteins per lane determined by Coomassie blue staining of the membrane or to the G3PDH, which was estimated by densitometric analysis.

Measurements of [Mg²⁺]_i with Mag-Fura-2-AM

Cells were grown in glass bottomed, black wall 96-well plates (BD Falcon) for 1 day before experiments. They were washed three times with normal buffered salt solution (NBSS) containing: 135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.33 mM NaH₂PO₄, 5 mM Glucose and 10 mM HEPES (pH 7.4). Measurement of the background fluorescence was performed after the last wash. Cells were further incubated for 30 min at 37 °C in NBSS containing 5 µM Mag-Fura-2-AM (Molecular Probes, France) and 0.1 % Pluronic F-127. Cells were washed twice with NBSS containing 0.1 mM K₂EGTA in place of 1.2 mM CaCl₂ for 20 min at 37 °C and measurement of fluorescence was performed. All fluorescence measurements were performed on Varioskan® Flash (Thermo Scientific) at 37 °C. Excitation wavelengths were 335 nm and 375 nm and the emission wavelength was 505 nm (12 nm bandwidth). All measurements of background fluorescence were subtracted from fluorescence measurements for each wavelength. [Mg²⁺]_i was calculated from the ratio of fluorescence at the two excitation wavelengths described above, using a dissociation constant $(K_{\rm d})$ of 1.9 mM, for the Mag-Fura-2-AM/Mg²⁺ complex. Fluorescence at 335 (F(335)) and 375 (F(335)) nm were used to determine the R value (R = F(335)/F(375)). All values of the measured R were normalized to the standard R value with identical optics and converted to $[Mg^{2+}]_i$ using the standard equation $[Mg^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{min}/$ $R_{\text{max}} - R$). Cells were permeabilized with 20 μ M digitonin and the Rmax value was obtained by the addition of 50 mM MgCl₂ in absence of Ca². Rmin was determined by chelating Mg^{2+} with addition of 100 mM EDTA (pH 7.2).

Measurements of Ca²⁺ influx through TRPM7

Cells were plated (30,000 cells/well) in glass bottomed, black wall 96-well plates (BD Falcon) in DMEM containing 10 % calf serum without blasticidine during 1 day before experiment. The culture medium was removed and replaced with loading buffer containing: 137 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 560 μ M MgCl₂, 1 mM Na2HPO4, 5.5 mM Glucose, 10 mM HEPES (pH 7.4) and the Fura-2 QBT Calcium dye (Molecular Devices) during 60 min at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere. The Fura-2 QBTTM Calcium Kits contain Fura-2, AM, a cell permeable calcium indicator that is ratiometric and UV-light excitable. Loading buffer was removed and replaced by the same buffer without Fura-2 and Ca²⁺ (1.8 mM CaCl₂ was

Deringer

replaced by 100 µM EDTA). Fluorescence quenching measurements (excitation wavelength: 360 nm; emission wavelength: 510 nm) were realized using Flextation3 plate reader (Molecular Devices; SoftMax Pro v5.4) at 37 °C [49]. Basal fluorescence at 360 nm excitation was read during 2 min before the addition of 2 mM MnCl₂ to follow constitutive calcium entry for 13 min. In order to assess the implication of TRPM7 in Ca²⁺ entries, activator Naltriben and inhibitor Waixenicin A were added 15 min before starting the reading (50 and 15 µM, respectively). Slope values were first normalized to average initial fluorescence (*F*₀) measured between 0 and 2 min (*F*_t = ($\Delta F/F_0$; $\Delta F = F_{\rm t(360)} - F_{\rm 0})$ and then normalized to control values (WT-CFTR = 100 %). The slope of the quenching which was estimating Ca2+ entry was calculated with GraphPad Prism 5 and presented as average \pm SD. Different conditions were compared using t test.

Patch clamp analysis

Patch-clamp experiments were performed with an automatic electrophysiology workstation, Port-a-Patch (Nanion Technologies GmbH, Germany), coupled to an external amplifier unit HEKA EPC-10 [28, 50]. Whole-cell patchclamp recordings were performed at room temperature on isolated cells. Before recording, the culture medium was replaced by the external solution contained the following: 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES and 5 mM D-glucose monohydrate [41, 51]. The final pH value was adjusted to 7.4 with NaOH and the osmolarity was 298 mOsmol. The internal solution contained the following: 50 mM CsCl, 10 mM NaCl, 60 mM Cs-Fluoride, 20 mM EGTA and 10 mM HEPES/CsOH (pH 7.2; 285 mOsmol). Inhibition of TRPM7 was performed by increasing the free $[Mg^{2+}]_i$ from 0 to 200 μ M, using MaxChelator software available at http://www. stanford.edu/ \sim cpatton/webmaxcS.htm, for Mg²⁺ calculation [41, 52]. In some experiments, seals were enhanced using the seal enhancer solution containing: 80 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 35 mM CaCl₂, 10 mM HEPES (298 mOsmol). All voltages were corrected for a liquid junction potential of 10 mV between external and internal solutions. For TRPM7 measurements, currents were elicited by a ramp protocol from -100 to +100 mV over 50 ms acquired at 0.5 Hz and a holding potential of 0 mV, as previously described [41, 52]. Voltage-clamp pulses were generated and data were captured using the Patchmaster program (Nanion Technologies GmbH, Germany). Outward currents at +80 mV, normalized to cell size ranging from 20 to 35 pF, and plotted against time, were recorded. For CFTR measurements, voltage-dependent properties were assessed by applying voltage steps of 100 ms duration from a holding potential of -80 mV to

2 Springer

test potentials ranging from -80 to +80 mV, with 10 mV increments [28]. Activation and inhibition of TRPM7 were obtained by Naltriben methanesulfonate (50 µM) and Carvacrol (500 µM), respectively, as previously described [53–56]. CFTR-inhibitor solution (10 µM CFTRinh172, Sigma) and CFTR-activator solution [10 µM forskolin (FSK) and 30 µM genistein (GST)], both from Sigma were added to the external solution to inhibit or activate CFTR, respectively. For all graphic representations of *I–V* relationships, currents were normalized by membrane capacitances (20–35 pF) to remove variability due to differences in cell sizes. For each patch-clamp analysis, measurements were made on three different cells from four different cultures.

Immunofluorescence

Cells were seeded on cover slips and incubated at 37 °C until 50-60 % confluence was obtained. After two washes with phosphate-buffered saline (PBS; 1X), cells were fixed in 4 % Paraformaldehyde (PFA) for 10 min. After fixation and three 5 min washes with PBS, cells were permeabilized with 0.2 % Triton X-100 in PBS (PBS-T) for 10 min. After 5 min washes with PBS, non-specific binding was prevented by blocking with 3 % Bovine Serum Albumin (BSA) in 1X PBS (2 h at room temperature). Primary antibody raised against TRPM7 (ab85016, Abcam) was applied overnight at room temperature with 3 % BSA in 1X PBS. After three 5 min washes with PBS-T, cells were incubated with Alexafluor 488 donkey anti-mouse IgG (Santa Cruz) secondary antibody (1:800 in 3 % BSA) for 1 h. Nuclei were labelled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma; 1:1000 in PBS 1X). Slides were mounted with Fluorsave (Calbiochem) and examined under a Zeiss AxioStar-Plus microscope. Images were collected with a Zeiss $100 \times$ objective.

Cell surface biotinylation

Cell surface biotinylation was performed as previously described [28]. Cells were grown in serum-free medium overnight. Culture medium was removed and cells were washed three times with PBS (1X plus 0.1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂) and once with PBS (1X). Cells were then exposed to sulfo-NHS-SS-biotin for 30 min on ice, rinsed twice with BSA quenching buffer (1 % BSA in PBS 1X, pH 7.4) and incubated 10 min in the same buffer. Cells were scraped in PBS (pH 7.4) and centrifuged at 2400 rpm (6 min, 4 °C). Cell pellets were suspended in RadioImmunoPrecipitation Assay buffer (RIPA) plus anti-proteases and incubated for 30 min on ice. The resulting lysates were centrifuged at 16,000g for 15 min at 4 °C and total cellular protein content was determined using Lowry's method

[47]. The supernatants were incubated with streptavidin beads overnight at 4 °C. After a brief centrifugation, supernatants were removed and the beads were washed four times in RIPA. Biotinylated proteins were eluted from streptavidin beads using 5X sample buffer containing 2-mercaptoethanol to cleave the NHS-SS-biotin. Biotinylated proteins (membrane proteins) and eluated proteins (non biotinylated proteins) were probed to assess TRPM7 expression using western blot experiments (mouse monoclonal anti-TRPM7, 1:200, N-17, sc-19562; Santa Cruz Biotechnology, USA). For normalization and to assess the membrane protein enrichment, Na⁺/K⁺-ATPase (a1 isoform) expression was assessed on the same blots, probed with a mouse monoclonal antibody (1:200, clone 9-A5, Santa Cruz Biotechnology, USA). For the detection of TRPM7 and Na⁺/K⁺-ATPase, the secondary antibody was anti-mouse (1:20,000; abcam ab6820). Experiments were performed twice with two different cultures.

STRING query of TRPM7's interaction network

The potential interactions of TRPM7 were evaluated using the online Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Protein (STRING 9.0, http://string-db.org) to predict both direct and indirect interactions [57]. The confident scoring of the interactions were based on known and predicted protein interactions collected from direct (physical) and indirect (functional) associations. The score was set at 0.7 to represent a high confidence level. The database quantitatively integrates interaction data from four sources-genomic context, high-throughput experiments, coexpression and previous knowledge from research publications. The results are presented with the input protein (in this case TRPM7) in the context of a graphical network of interaction partners. Associations in STRING are provided with a probabilistic confidence score, which represents an estimate of how likely a given association describes a functional linkage between two proteins. The computed score indicates a high confidence when more than one type of information supports the association (direct physical interactions, text mining or experimental).

Statistics

Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between experimental groups were evaluated by a two-tailed unpaired Student's *t* test. p < 0.05 was considered statistically significant (*), p < 0.001 was considered very statistically significant (**) and p < 0.0001 was considered highly statistically significant (***).

Results

Measurements of $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR or G551D-CFTR

HeLa cells stably expressing WT-CFTR, ΔF508-CFTR and G551D-CFTR were previously described regarding CFTR expression and function [45, 57]. $[Mg^{2+}]_i$ was measured using Mag-fura-2-AM, an intracellular Mg²⁺ indicator that is ratiometric and UV light-excitable [59-61]. Measurements were performed at 37 °C because at room temperature cells did not stick in the wells and because this temperature was physiologically relevant. As shown in Fig. 1, the statistical analysis indicates that $[Mg^{2+}]_i$ is significantly lower in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR compared to those expressing WT-CFTR. Furthermore, the levels of $[Mg^{2+}]_i$ in the cells expressing the mutated CFTR were close to that observed in NT Hela cells. [Mg²⁺]_i was also significantly lower in cells expressing G551D-CFTR compared to those expressing Δ F508-CFTR.

Detection and quantitation of TRPM7's mRNA and protein

Basal TRPM7 mRNA expression was assessed in NT, WT-CFTR, Δ F508-CFTR and G551D-CFTR cells. As shown in Fig. 2a (left panel), a single PCR amplicon (200 bp) was observed indicating that endogenous TRPM7 was relatively abundant in all four cell-lines. No signal was observed in the negative control. A control, G3PDH, was also amplified by PCR (with an amplicon of 121 bp) in the same samples and showed no variation in signal intensity



Fig. 1 Ratiometric measurement of $[Mg^{2+}]_i$. $[Mg^{2+}]_i$ was estimated using Mag-Fura-2-AM in NT cells and in WT-CFTR, Δ F508-CFTR or G551D-CFTR cells. The *bar chart* represents the result of the statistical analysis (n = 6) and shows that $[Mg^{2+}]_i$ is significantly lower in F508del-CFTR and G551D-CFTR experiments compared to comparable levels in cells expressing WT-CFTR or NT cells. Furthermore, $[Mg^{2+}]_i$ is significantly lower in cells expressing G551D-CFTR compared to those expressing Δ F508-CFTR. Statistical analysis was performed with results obtained from three different cell cultures

Deringer



Fig. 2 Expression of TRPM7. **a** The *left image* shows (1) the molecular weight marker and an example of representative PCR amplicons for TRPM7 (200 bp) in Hela cells (2) not transfected, or transfected with (3) WT-CFTR, (4) Δ F508-CFTR or (5) G551D-CFTR. (6) is the negative control. The *right bar* chart is the quantitative analysis of *TRPM7* gene expression, determined by quantitative PCR in each cell line. Data were analyzed by using Δ Ct (target—reference) methodologies [28] with no differences observed between cells lines. **b** The *left image* shows representative

(not shown). TRPM7 mRNA expression was quantified by qPCR and no differences between the cells were observed (Fig. 2a, right panel).

Western blots were performed using whole cell lysates to detect the basal expression of TRPM7 protein (212 kDa, Fig. 2b, left panel) in the cell-lines. TRPM7 protein was observed in all four cell-lines. Statistical analysis showed some differences between TRPM7 protein levels between the cells, after normalization with an internal control, G3PDH (37 kDa), or total protein (Fig. 2b, right panel). The levels of TRPM7 protein were significantly higher in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR compared to cells expressing mutated CFTR. Lower levels of TRPM7 protein were observed in cells expressing WT-CFTR or G551D-CFTR when compared to NT cells. This difference was not found in cells expressing Δ F508-CFTR.

Cellular localization of TRPM7

Cellular localization of TRPM7 using a specific primary antibody was performed in NT cells and in cells expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR and G551D-CFTR (Fig. 3). First, negative controls in which the anti-TRPM7 antibody

🖄 Springer

immunodetection experiments of the TRPM7 protein (212 kDa) in Hela cells (1) not transfected, or expressing (2) WT-CFTR, (3) Δ F508-CFTR or (4) G551D-CFTR. Statistical analysis (*right*) shows that the expression of TRPM7 is increased in both Δ F508-CFTR and G551D-CFTR experiments compared wildtype assays. Nevertheless, there is less TRPM7 protein in cells expressing G551D-CFTR compared to those expressing Δ F508-CFTR. Furthermore, TRPM7 expression is decreased in cells expressing WT-CFTR compared to NT cells (n = 6)

was omitted were performed in order to show the specificity of the labelling (Fig. 3a–d). Whereas the membrane localization of TRPM7 was likely not observed in NT cells (Fig. 3e–g), the protein was observed at the plasma membrane in the cells expressing WT-CFTR (Fig. 3h–j) and Δ F508-CFTR (Fig. 3k–m) despite a less strong labelling in these latest cells. As in all cell types, the protein was observed throughout the entire cell with a vesicular pattern in G551D-CFTR cells, with no labelling at the membrane (Fig. 3n–p). The membrane localization of TRPM7 was thus increased in WT-CFTR, decreased in Δ F508-CFTR and absent in membranes of cells expressing G551D-CFTR. Nevertheless, the protein was observed throughout the entire cell with a vesicular pattern in all cell lines.

To further confirm our findings regarding the localization of TRPM7, biotinylation experiments were performed (Fig. 4) [28]. Membrane proteins were biotinylated and TRPM7 expression was assessed by western blottings (Fig. 4a). In order to show the enrichment of the membrane proteins within the biotinylated fractions, Na⁺/K⁺-ATPase detection was performed. It was observed that the expression of TRPM7 is higher in cells expressing WT-CFTR and Δ F508-CFTR than in NT cells. The expression was found to be lower in Δ F508-CFTR than in WT-CFTR cells. The



Fig. 3 Cellular localization of TRPM7. Immunofluorescence was performed to localize TRPM7 in NT cells (**a**, **e**, **f**, **g**) and in cells expressing WT-CFTR (**b**, **h**, **i**, **j**), Δ F508-CFTR (**c**, **k**, **l**, **m**) and G551D-CFTR (**d**, **n**, **o**, **p**). First, negative controls in which first antibody is omitted shows the specificity of the labelling (**a**, **b**, **c**, **d**). Vesicular labelling in the cytoplasm is observed in all four cell types;

however, membrane localization is mostly seen in cells expressing WT-CFTR (**i**, **j**) and Δ F508-CFTR (**l**, **m**). This membrane localization is likely not observed in NT cells (**f**, **g**). The labelling is less visible in Δ F508-CFTR (**l**, **m**) and lost in G551D-CFTR cells (**o**, **p**). Nuclei were DAPI stained (*blue*, **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **h**, **i**, **j**, **k**, **l**, **m**, **n**). Images were collected with a 100× objective. *Bars* represent 10 µm

lowest expression of TRPM7 was observed in the membrane of cells expressing G551D-CFTR. Despite no statistical analysis was done because of the low number of experiments (n = 2), bar charts were drawn (Fig. 4b).

After normalization by Na^+/K^+ -ATPase expression, the densitometric analysis of the TRPM7 bands showed that the membrane localization of the protein was consistent with the results obtained by immunofluorescence.

2 Springer

3358



Fig. 4 Detection of TRPM7 within membranes by biotinylation experiments. a Representative immunoblots showing the detection of TRPM7 and Na⁺/K⁺-ATPase in NT (1), WT-CFTR (2), Δ F508-CFTR (3) and G551D-CFTR (4) cells, in biotinylated surface proteins and in non biotinylated proteins (Eluates). TRPM7 is present in the membrane fraction whereas it is likely not observed in non biotinylated proteins. The *lower panel* showing the presence of a specific membrane protein (Na⁺/K⁺-ATPase) in the biotinylated fractions indicates that membrane proteins were enriched in the cell surface expression of TRPM7 after normalization by Na⁺/K⁺-ATPase. The level of TRPM7 is higher in the membranes of WT-CFTR and Δ F508-CFTR cells than in NT and G551D-CFTR cells

Function and regulation of TRPM7

The native function of TRPM7 channels in the plasma membrane was assessed by recording of whole-cell currents in NT cells and in cells expressing WT-CFTR, ΔF508-CFTR and G551D-CFTR (Fig. 5). Activation of endogenous TRPM7-mediated currents was obtained by a voltage ramp (-100 to +100 mV in 50 ms intervals) and was used to determine current-voltage relationships. I-V relationships were determined at the time point when current magnitude reached maximum for each cell, with an internal Mg^{2+} free solution. *I–V* curves were drawn after normalization of the currents by cell capacitances. From the I-V curves (Fig. 5a, left panel) it was observed that TRPM7 channel function is drastically reduced in cells expressing mutant CFTR when compared to that of NT cells or to those expressing WT-CFTR. Currents in G551D-CFTR cells were weaker than those measured in cells expressing Δ F508-CFTR. Statistical analysis was performed and is presented as bar chart (Fig. 5a, right panel). Whereas currents are similar in NT and WT-CFTR cells, they were significantly decreased in cells expressing ΔF508-CFTR and G551D-CFTR. A difference was observed between cells expressing the mutated CFTR with lower currents in G551D-CFTR cells than in Δ F508-CFTR

cells. TRPM7 is inhibited by Mg^{2+} [48]. Therefore, inhibition was induced by adding 200 µM Mg^{2+} in the intracellular solution, and *I–V* curves were recorded and compared to those obtained without divalent ions (Fig. 5b, left panel). It was observed that the presence of Mg^{2+} inhibited TRMP7 currents in NT cells as well as in cells expressing WT-CFTR. No effect was seen in Δ F508-CFTR or G551D-CFTR experiments. Statistical analysis (Fig. 5b, right panel) showed that 200 µM Mg^{2+} inhibited TRPM7 in NT and WT-CFTR cells and had no effect in the cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR. The latter results suggested that TRPM7 regulation by intracellular Mg^{2+} is altered in cells expressing mutant CFTR.

Modulation of TRPM7 channel function by Mg-ATP, Naltriben and Carvacrol

Outward currents at +80 mV were recorded, and curves were drawn after normalization to cell sizes and plotted against time. Inhibition and activation of TRPM7 were achieved by using 500 µM Carvacrol and 50 µM Naltriben in cells expressing WT-CFTR, respectively. The drugs were applied 100 s after the start of the experiments (Fig. 6a). Activation was performed and observed in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR, as currents were already very low when compared to those observed in WT-CFTR experiments (Fig. 6b, c, respectively). These results indicated that the recorded currents were due to TRPM7, which is consistent with previous reports [53-56]. Nevertheless, due to lower basal currents in ∆F508-CFTR and G551D-CFTR experiments, the effect of Naltriben was lower when compared to cells expressing WT-CFTR. The measurements presented in Fig. 5 also confirm that the function of TRPM7 is altered when mutant CFTR is expressed in cells.

Mg-ATP is requested to measure the Cl⁻ channel activity of CFTR [19, 36] and also inhibits TRPM7 [38]; therefore, the effects of Carvacrol and Natrilben in cells expressing WT-CFTR were assessed in the presence of intracellular Mg-ATP (Fig. 7). The same conditions were used as the previous set of experiments (see Fig. 6), except that 5 mM Mg-ATP was present in the intracellular solution. Figure 7a shows the time course of the currents with or without Mg-ATP in the intracellular buffer. It is observed that Mg-ATP inhibited TRPM7 activity in WT-CFTR experiments as expected. Furthermore, inhibition and activation of TRPM7 by Carvacrol and Natrilben, respectively, were obtained in cells expressing WT-CFTR in the presence of Mg-ATP, (Fig. 7b, c). However, the action of the drugs was lowered by decreased TRPM7 function due to the presence of 5 mM Mg-ATP in the intracellular solution. Figure 8 shows the activation and the inactivation of TRPM7 in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR in the presence of 5 mM Mg-ATP. Figure 8a (upper panel)



Fig. 5 Function and regulation of TRPM7. Patch-clamp analysis was performed in NT Hela cells and in cells expressing, WT-CFTR, Δ F508-CFTR or and G551D-CFTR. **a** The *left panel* shows example current-voltage (I-V) relationships for TRPM7 channels obtained in the four cell lines with Mg²⁺-free intracellular solution. *I–V* relationships were taken at the time point when current magnitude reached maximum for each cell. Statistical analysis was performed using the pA/pF values taken at 100 mV and are presented as *bar chart (right panel)*. Whereas currents are similar in NT and WT-CFTR cells, they were significantly decreased in Δ F508-CFTR and

shows the time course of Δ F508-CFTR-induced currents, with or without Mg-ATP in the intracellular buffer, and it was deduced that Mg-ATP inhibited TRPM7 activity in the presence of mutant CFTR. Figure 8a (lower panel) shows that TRPM7 was activated and inactivated in the presence of Naltriben and Carvacrol, respectively, despite the presence of Mg-ATP in the intracellular solution. In Fig. 8b (upper

G551D-CFTR cells. A difference is also observed between cells expressing the mutated CFTR. The currents are significantly lower when in G551D-CFTR cells than in Δ F508-CFTR cells. **b** Comparison of the *I*-*V* relationships for TRPM7 channels in the four cell lines, with 200 μ M Mg²⁺ and without Mg²⁺ in the intracellular solution (*left panel*). *Bar chart (right panel*) shows that whereas the function of TRPM7 is inhibited by Mg²⁺ in NT and WT-CFTR cells, no inhibition is observed in the cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR

panel), it was observed that TRPM7 currents in cells expressing G551D-CFTR were poorly inhibited by Mg-ATP in the intracellular buffer. Once again, TRPM7 was activated in this mutant cell-line in the presence of Naltriben, despite the presence of Mg-ATP in the intracellular solution (Fig. 8b, lower panel). Inactivation by Carvacrol was lower than in Δ F508-CFTR cells.

Deringer

Fig. 6 Modulation of TRPM7 function in the absence of intracellular Mg^{2+} . The temporal development of TRPM7 currents were extracted from individual ramp current recordings by measuring current amplitudes at a voltage of +80 mV. a (upper panel) Curve showing time-dependent currents measured in the absence of intracellular ${\rm Mg}^{2+}$ (black) and in the presence of Carvacrol (grey) in cells expressing WT-CFTR. The inhibitory effect of Carvacrol is observed. a (lower panel). Curve showing time-dependent currents measured in the absence of intracellular Mg²⁺ (black) and in the presence of Naltriben (grey) in cells expressing WT-CFTR. Activation of TRPM7 is observed. b Curve showing time-dependent currents measured in the absence of intracellular Mg^{2+} (*black*) and in the presence of Naltriben (grey) in cells expressing ΔF508-CFTR. Activation of TRPM7 is observed. c Curve showing time-dependent currents measured in the absence of intracellular Mg²⁺ (black) and in the presence of Naltriben (grey) in cells expressing G551D-CFTR. Activation of TRPM7 is observed. The curves presented in **a**, **b** and **c** are the mean curves of three cells from three different cell cultures



Measurement of CFTR channel function in the presence of Naltriben

CFTR function was measured by patch-clamping in cells expressing WT-CFTR, Δ F508-CFTR or G551D-CFTR (*n* = 3 cells from four different cell cultures for each cell

🖄 Springer

type). Activators (FSK and GST) and inhibitor (Inhibitor 172) of CFTR were used to ensure the specificity of the recordings (Fig. 9a). Figure 9b shows the normalized I-V curve obtained in WT-CFTR experiments, in the presence of either Naltriben or Carvacrol. It was observed that TRPM7 inhibition had no effect on CFTR function,

Fig. 7 Modulation of TRPM7 function in WT-CFTR experiments, in the presence of 5 mM Mg-ATP. The same conditions as in Fig. 5 were used except that 5 mM Mg-ATP was present in the intracellular solution. a Time course of currents with (grey) or without (black) Mg-ATP in the intracellular buffer. Mg-ATP inhibited TRPM7 activity in cells expressing WT-CFTR. The inlet shows the initial decrease of currents due to Mg-ATP, whereas in the absence of Mg ATP the initial currents increase. b Inhibition of TRPM7 by Carvacrol (grey). c Activation of TRPM7 by Natrilben



whereas TRPM7 activation by Naltriben led to decreased WT-CFTR channel function (Fig. 9b). A significant decrease in WT-CFTR function (-26 %) was observed in the presence of Naltriben, but no significant effect was detected by the addition of Carvacrol (Fig. 9c). For cells expressing Δ F508-CFTR (Fig. 10), *I*–V curves which were obtained in the presence of Naltriben and showed a significant decreased function of the mutated protein (Fig. 10a). This decreased function was more important than that of the specific inhibitor 172 (-39.8 %, Fig. 10b). I-V curves were also obtained in the presence of Naltriben in cells expressing G551D-CFTR (Fig. 11). I-V curves showed that Naltriben activated the function of G551D-CFTR and that this activation was higher than that of the addition of FSK plus GST. Indeed, a significantly increased chloride channel activity of G551D-CFTR (+824.2 %) was observed (Fig. 11b).

Measurements of Ca²⁺ influx through TRPM7

TRPM7 channel conductance was monitored using a FlexStation 3 scanning fluorometer to monitor the Ca²⁺-independent (360-nm excitation/510-nm emission) fura-2 quenching by Mn²⁺ in cells, as previously described [62]. As shown in Fig. 12a, the curves representing Ca²⁺ influx which were measured in all the cell types (n = 6 for each cell type), presented some differences among the cell types. Bar charts (Fig. 12b) were drawn using the average slope values of the quenching. Quenching rates were not different in WT-CFTR and NT cells. Ca²⁺ influx through TRPM7 was lower in cells expressing Δ F508-CFTR than in WT-CFTR cells. At the opposite, it was increased in the cells expressing G551D-CFTR. Whereas, Waixenicin A had no significant effect upon the quenching rates, Naltriben

🖄 Springer

Fig. 8 Activation of TRPM7 function in cells expressing either AF508-CFTR or G551D-CFTR, in the presence of 5 mM Mg-ATP. The same conditions as in Fig. 5 were used except that 5 mM Mg-ATP was present in the intracellular solution. a (upper panel) Time course of currents in cells expressing F508del-CFTR, with (grey) or without (black) Mg-ATP in the intracellular buffer. Mg-ATP inhibited TRPM7 activity in F508del-CFTR experiments. a (lower panel) TRPM7 is activated and inhibited in the presence of Naltriben or Carvacrol, respectively, despite the presence of Mg-ATP in the intracellular solution, b (upper panel). Time course of currents in cells expressing G551D-CFTR, with (grey) or without (black) Mg-ATP in the intracellular buffer. Mg-ATP failed to inhibit TRPM7 activity in these cells. **b** (*lower panel*) TRPM7 is activated and poorly inhibited by Naltriben or Carvacrol, respectively in cells expressing G551D-CFTR, despite the presence of Mg-ATP in the intracellular solution



significantly increased the Ca²⁺ influx in cells expressing Δ F508-CFTR when compared to non-treated Δ F508-CFTR cells. The same recordings, using the same conditions as for Hela cells were performed in native HEK293 cells (n = 13). The quenching curves are presented in Fig. 12c (upper panel). The statistical analysis was performed and is presented as bar charts in Fig. 12c

(lower panel). In these cells, a significant activation and inhibition of the Ca²⁺ influx through TRPM7 was obtained by the use of Naltriben (n = 10) and Waixenicin A (n = 6), respectively. This indicates that the absence of modulation observed in the Hela cells expressing WT-CFTR is likely due to the cell types and is not due to technical artifacts.

Deringer

Fig. 9 Inhibition of WT-CFTR currents by Naltriben. a I-V curves (normalized by cell capacitance pF, mean \pm SEM) for CFTR currents in WT-CFTR expressing cells, with 5 mM Mg-ATP in the intracellular buffer. CFTR was activated by FSK and GST, and inhibited by CFTR inhibitor 172, indicating that the recorded currents were due to CFTR. b Curves obtained in the presence of Naltriben and Carvacrol were plotted. Naltriben and Carvacrol activates and inhibites CFTR, respectively. c Bar chart showing the statistical analysis of the currents noted at +80 mV indicating that WT-CFTR function is decreased in the presence of Naltriben



Prediction of the protein-protein interaction network of TRPM7

The interaction network of TRPM7 was evaluated with the online Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/ Protein to predict both direct and indirect interactions [54]. As shown in Fig. 13, based on bibliographic analysis, putative interacting partners of TRPM7 were found to be annexin A1 (ANXA1, score: 0.925); myosin heavy chain 9 (non-muscle, MYH9, score: 0.910); kininogen 1 (KNG1, score: 0.885); transient receptor potential cation channel 5, subfamily V, member 5 (TRPV5, score: 0.869); transient receptor potential cation channel 6, subfamily VI, member 6 (TRPV6, score: 0.859); myosin heavy chain 10 (non-

 $\underline{\textcircled{O}}$ Springer
Fig. 10 Inhibition of AF508-CFTR currents by Naltriben. a I-V normalized curves for CFTR currents in cells expressing Δ F508-CFTR (whole-cell configuration with 5 mM Mg-ATP in the intracellular buffer) in the presence or absence of Naltriben. CFTR was activated by FSK and GST and inhibited by CFTR inhibitor 172, indicating that the recorded currents were due to CFTR. The inhibition by Naltriben is more efficient than that of inhibitor 172. b Bar chart showing the statistical analysis of currents (+80 mV) indicating that Δ F508-CFTR function is decreased by Naltriben



muscle, MYH10, score: 0.853); transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1, (VR1, score: 0.834); transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1, score: 0.832); transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 (TRPV4, score: 0.832); and phospholipase C (beta 1, PLCB1, score: 0.836). Biochemical evidence was only depicted for annexinA1 (ANXA1), myosin heavy chain 9 (MYH9), myosin heavy chain 10 (MYH10) and phospholipase C beta 1 (PLCB1). ANXA1 is a Calcium/ phospholipid-binding protein which promotes membrane fusion and is involved in exocytosis. It also regulates phospholipase A2 activity. MYH9 and MYH10 are non-muscle cellular myosins that play a role in cytokinesis, cell

2 Springer

shape and secretion. PLCB1 which is phosphoinositidespecific, catalyzes the formation of inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol from phosphatidylinositol 4,5bisphosphate. This reaction uses calcium as a cofactor and plays an important role in the intracellular transduction of many extracellular signals.

Discussion

Magnesium ions, being one of the most abundant intracellular cations present at a cellular molar concentration of 1×10^{-2} [59], are essential for a wide variety of biochemical reactions and physiological functions. Mg²⁺ is Fig. 11 Activation of G551D-CFTR currents by Naltriben. a I-V normalized curves for CFTR currents in cells expressing G551D-CFTR (with 5 mM Mg-ATP in the intracellular buffer) plus Naltriben. CFTR was activated by FSK and GST, and inhibited by CFTR inhibitor 172, indicating that the recorded currents were due to CFTR. The activation by Naltriben is more efficient than that of FSK plus GST. b Bar chart showing the statistical analysis of currents (+80 mV) indicating that G551D-CFTR function is very significantly increased by Naltriben



especially important for enzymes that require nucleotides (e.g. kinases, G-proteins and ATPases), as the biologically active form of ATP is the Mg-ATP complex. $[Mg^{2+}]_i$ is known to regulate the expression of CFTR. Knowing that a decrease in $[Mg^{2+}]_i$ leads to reduced opening and closing rates of the CFTR channel [34], we first estimated the Mg^{2+} content of cells expressing WT-CFTR, and Δ F508-CFTR and G551D-CFTR mutants. The Δ F508 and G551D mutations were chosen because once mutant proteins reach plasma membranes, they exhibit decreased and altered Cl⁻ channel function, independently of their membrane localisation [14–16]. We observed a decreased $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing Δ F508-CFTR or G551D-CFTR compared to that of cells expressing WT-CFTR. The effects of changes in the concentration of free Mg²⁺ on the activity of CFTR Cl⁻ channels were previously investigated and it was shown that Mg²⁺ facilitates ATP binding that opens the CFTR channel [36]. Indeed, in an excised inside-out membrane patch experiment, removing Mg²⁺ from the cytosolic solution reduced, but did not abolish, CFTR activity and addition of Mg²⁺ restored the Cl⁻ currents. Therefore, altered levels of [Mg²⁺]_i in cells expressing mutant CFTR could explain, at least in part, the observed altered Cl⁻ channel functions related to some mutations of

Deringer

3366



Fig. 12 Measurements of Ca^{2+} influx through TRPM7. a Example of quenching curves showing the Ca^{2+} influx which were measured in all the cell types. The *upper panel* shows a set of curves obtained in the absence and in the presence of TRPM7 activator. The *lower panel* shows the curves obtained without and in the presence of TRPM7 inhibitor. **b** *Bar charts* show the average slope values of the quenching, taken at the 300 s time point. A significant difference was observed among the different cell types. Without any modulator of TRPM7, the quenching rate was significantly higher in G551D-CFTR than in WT-CFTR or NT cells. At the contrary, the quenching rate

CFTR. This hypothesis is reinforced by the fact that we saw less Mg^{2+} in cells expressing G551D-CFTR than in those expressing Δ F508-CFTR. This decreased $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing Δ F508-CFTR and G551D-CFTR can be correlated to the described specific alterations in the channel function mediated by these two mutants [14-17, 36, 45, 58]. It was also observed that $[Mg^{2+}]_i$ is higher in cells expressing WT-CFTR compared to NT cells. This latter point led us to postulate that CFTR itself is likely involved in the regulation of intracellular Mg^{2+}, as it does for Ca²⁺ regulation [32]. Nevertheless, this hypothesis requires further evidence for its validation.

Deringer

was lower in cells expressing Δ F508-CFTR than in WT-CFTR, G551D-CFTR and NT cells. Whereas, the TRPM7 inhibitor Waixenicin A had no significant effect upon the quenching rates, Naltriben significantly increased the quenching rate in cells expressing Δ F508-CFTR. c Ca²⁺ influx through TRPM7 was measured in HEK293 cells. The *upper panel* shows an example of quenching curves obtained without and with modulation of TRPM7. The *lower panel* shows the corresponding *bar charts* indicating that Naltriben and Waixenicin A significantly activates and inhibits TRPM7, respectively

 $[Mg^{2+}]_i$ is finely regulated by precise mechanisms that balance Mg^{2+} uptake, intracellular Mg^{2+} storage and Mg^{2+} efflux. Whereas extremely slow turn-over of Mg^{2+} across the cell plasma membrane under quiescent conditions is described, some efforts have been made to identify and characterize the complex network of Mg^{2+} -specific transporters (for review [61]). The main vertebrate Mg^{2+} cellular transporters identified are Ancient Conserved Domain Protein (Acdp2) [63]; Magnesium Transporter 1 (MagT1) [64]; Mitochondrial RNA splicing 2 protein (Mrs2) [65]; Claudin 16 [66]; SoLute Carrier family (SLC41A1 and A2) [67, 68]; TRPM6 [69]; and TRPM7 Fig. 13 Network of predicted interactions for TRPM7 obtained by STRING. *Blue connecting lines* indicate that the interaction/s are mentioned in PubMed abstracts. Interactions with Annexin A1 (ANXA1), myosin heavy chain 9 non-muscle (MYH9), myosin heavy chain 10 non-muscle (MYH10) and phospholipase C beta 1 (PLCB1) were given due to experimental data. Scores were set above 0.7 for high confidence



[38, 42]. We focused our study on the ubiquitous TRPM7 chanzyme, which is presented as the main $[Mg^{2+}]_i$ regulator of [41].

The quantitative mRNA analysis of TRPM7 showed that there was no difference in the presence or absence of CFTR within cells or when mutant CFTR is expressed. Therefore, the gene expression of TRPM7 itself is unlikely involved in the $[Mg^{2+}]_i$ differences that were observed. The quantitation of TRPM7 protein levels in the cells was surprising when it was correlated to the measured $[Mg^{2+}]_i$. Indeed, low $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR corresponded to high levels of TRPM7 protein expression. By contrast, high $[Mg^{2+}]_i$, which was observed in WT-CFTR experiments, correlated well to a low amount of protein. Thus, we hypothesized that the cellular localization, function, and regulation of the TRPM7 channel could be involved in the decreased $[Mg^{2+}]_i$ in the cells expressing mutant CFTR.

Immunofluorescence and biotinylation experiments showed a vesicular labelling in the cytoplasm in all three cell types, with membrane expression being mostly seen in WT-CFTR experiments. Membrane localization was lower in cells expressing Δ F508-CFTR and likely absent when G551D-CFTR was expressed. These results are consistent with previously described studies [37, 41, 70, 71]. Furthermore, it was reported that TRPM7 can be translocated within cells in response to external stimulation. For example, TRPM7 accumulates within cells in response to an increased fluid flow and is localized at the plasma membrane in physiological condition, in <100 s [70]. In our experiments, the cellular modifications due to the CFTR mutations could explain the altered membrane localization of TRPM7. Furthermore, the altered membrane localization of TRPM7 in Δ F508-CFTR and mostly in G551D-CFTR cells could fully explain the decreased [Mg²⁺]_i in these cells.

Although the decreased membrane localization of TRPM7 in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR is sufficient to explain decreased [Mg²⁺]_i, we studied its channel function. We observed that TRPM7 channel activity was decreased and almost abolished in Δ F508-CFTR and G551D-CFTR experiments, respectively. TRPM7 regulation by increasing Mg²⁺ was also evaluated according to previous studies [41–44] and we found that it did not respond in cells containing mutant CFTR. As in our cell model, amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease are epidemiologically linked to a severe deficiency in Mg²⁺ [72]. In these disorders, a TRPM7 variant was found in some patients that produces a protein with a missense mutation (T1482I). Further

🖄 Springer

analysis indicated that a recombinant T1482I-TRPM7 mutant exhibited the same kinase catalytic activity as wildtype TRPM7, with an increased sensitivity to inhibition by intracellular Mg^{2+} [69]. Therefore, in our study the kinase activity of the alpha-kinase domain fused to the ion channel moiety of TRPM7 (for review, [44]) is unlikely to be involved in altering channel function and regulation. The functional interaction between the TRPM7 channel and kinase activity is poorly understood, although it has been shown that TRPM7 kinase activity is not essential for channel activation [39]. Nevertheless, it is also reported that the kinase activity of TRPM7 plays a role in modulating channel activity and that it is itself affected by Mg²⁺ availability [41, 42, 44]. Thus, we propose that a vicious circle occurs in cells expressing mutant CFTR in which altered TRPM7 function leads to a decrease in $[Mg^{2+}]_i$, which in turn modifies the regulation of TRPM7 channel activity.

 Mg^{2+} coordinates the γ phosphate of ATP and is required for hydrolysis by most enzymes [73]. Indeed, chelating Mg^{2+} abolishes ATP hydrolysis [32], which is necessary for CFTR channel function [19, 35]. Therefore, we hypothesized that the altered activity of TRPM7 presented here is linked to modifications in the function of Δ F508-CFTR and G551D-CFTR and we speculated that restoring TRPM7 function could play a positive role in the activity of CFTR. To answer this question, we performed experiments using Naltriben to activate TRPM7 [53, 54]. Whereas Mg-ATP inhibits TRPM7 [38], it has to be used in patch-clamp experiments to measure the function of CFTR [19, 36]. We performed these experiments in the presence of 5 mM Mg-ATP. This experimental condition permitting the electrophysiological recording of CFTR showed that TRPM7 was still active, despite a decreased function. CFTR Cl⁻ channel function was thus recorded in the presence of a TRPM7 activator, according to previously described whole-cell methods [45, 58]. Naltriben led to a decrease in Cl⁻ channel activity for WT-CFTR and Δ F508-CFTR. By contrast, we observed that TRPM7 activation leads to an increased G551D-CFTR channel function. CFTR is unique amongst ion channels as it is dependent not only on PKA-mediated phosphorylation, but also on ATP binding and hydrolysis [74, 75] by the nucleotidebinding domains (NBDs) which require Mg-ATP [35]. Mg-ATP was found to increase channel activity with a saturating effect above 1 mmol/l [76]; however, it was observed that whole-cell CFTR Cl⁻ currents (activated by FSK) were diminished by increasing the cytosolic free Mg²⁺ level, even when maintaining Mg-ATP in the cytosol above millimolar concentrations [77]. This could explain why activation of TRPM7 leads to decreased CFTR function in cells expressing WT-CFTR and Δ F508-CFTR. In G551D-CFTR experiments, [Mg²⁺]_i is much lower

Description Springer

compared to cells expressing either WT-CFTR or Δ F508-CFTR and TRPM7 is poorly present in membranes were it exhibits very weak channel activity. Therefore, it can be postulated that the activation of TRPM7 by Naltriben leads to increased [Mg²⁺]_i that remains below the inhibitory level for CFTR. Therefore, we show here for the first time that Naltriben is a new potentiator of the G551D-CFTR mutant protein. The presented negative effect of Naltriben on the function of Δ F508-CFTR was also reported for other potentiators such as VX-770 (Ivacaftor, [78]). Indeed, whereas VX-770 treatments rescue G551D CFTR function, it inhibits functional rescue of Δ F508 CFTR and reduces the membrane stability of WT-CFTR.

The role of TRPM7 upon CFTR function is unlikely due to $[Mg^{2+}]_i$ modulation alone, but may also involve protein– protein interactions and/or the serine/threonine protein kinase domain at the distal C-terminus. Indeed, the C-terminus of TRPM7 contains a TRP box (~25 highly conserved residues) that may interact with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂, for review [79]), which activates CFTR in the complete absence of Mg^{2+} [80]. Knowing that the kinase domain of TRPM7 also shows some similarity to cAMP-dependent PKA which also activates CFTR [18, 19], TRPM7 may act on CFTR in many ways involving a multitude of protein interactions. Amongst the proteins predicted to interact with TRPM7, biochemical evidence was only identified for ANXA1, MYH9, MYH10 and PLCB1. MYH and PLCB1 were shown to be involved in CFTR localization and/or function [81, 82]. Thus, it is clear that further experiments are required to ascertain whether altered TRPM7 function and regulation acts upon mutant CFTR or whether the converse interaction occurs.

Beside protein-protein interactions, Ca²⁺ is more likely involved in the altered function and regulation of TRPM7 in CF cells, for at least three reasons. First, it was previously described that TRPM7 channels are inhibited by intracellular Ca²⁺ [37-39, 44, 71, 83]. Second, a larger mobilization of Ca²⁺ ions in CF bronchial epithelial cells is well described [29-33, 84]. Third, the implication of other TRP channels (TRPV5 and TRPV6) [82] in the increase of Ca²⁺ influx in CF bronchial epithelial cells were studied and it was shown that this increase is mostly due to an upregulation of TRPV6 activity. Therefore, we propose that the altered function and regulation of TRPM7 presented here are due to an increase in Ca^{2+} influx in Δ F508-CFTR cells. This is reinforced by our findings where decreased $[Mg^{2+}]_i$ in cells expressing mutant CFTR is not involved in the altered function of TRPM7. In order to assess our hypothesis, we measured Ca²⁺ influx via TRPM7 in cells expressing WT-CFTR, ΔF508-CFTR and G551D-CFTR. The Ca²⁺ conductance of TRPM7 has been previously measured using fluorescent cation binding dyes [43], commonly using the ratiometric properties of the Ca²⁺ binding dye fura-2 [61]. Based on its TRPM7 permeability and high fura-2 binding affinity, we used Mn^{2+} as the quenching reagent in our assay. Measuring TRPM7-mediated Mn²⁺ entry, rather than Ca²⁺, affords several advantages. First, some competing cations entry pathways [e.g., calcium-release activated calcium (CRAC) channels] are less permeable than TRPM7 to Mn²⁺. Second, CRAC channel currents can be further disconnected by avoiding Ca²⁺-deficient assay conditions, which are needed for optimal measurement of Ca²⁺ influx. Third, it allowed us to realize our experiment in the presence of physiological levels of Ca²⁺ and Mg²⁺ [43]. Because Waixenicin A (a xenicane diterpenoid from the Hawaiian soft coral S. edmondsoni) [85] inhibits TRPM7-mediated Mn2+ quench in a dose-dependent manner and because its inhibitory effect is strongly dependent on the intracellular Mg²⁺ concentration [86], it was used, due to the observed variations in [Mg²⁺]_i among our cell types. We observed a decreased and increased Ca²⁺ influx through TRPM7 in ΔF508-CFTR and G551D-CFTR, respectively. Regarding the cells expressing Δ F508-CFTR, this is in accordance with our results showing a decreased function of TRPM7 in these cells. Regarding the cells expressing G551D-CFTR, we found an increased Ca²⁺ influx via TRPM7 which was not in accordance with a decreased function of the channel. Therefore, we hypothesize that in this cell type the behaviour of TRPM7 may vary among ions. This point has to be further studied. We also noticed that the drug modulation of TRPM7 by Naltriben and Waixenicin A was difficult to detect in Hela cells. In order to show that this was not due to our experimental conditions, we performed the same experiments in HEK293 cells which have a high level of TRPM7 expression [38]. In native HEK293 cells, a modulation of TRPM7 was observed. This led us to conclude that the TRPM7 modulation was altered in Hela cells expressing a mutated CFTR and that the involvement of TRPM7 in constitutive Ca²⁺ influx is different among cell types. This cell-dependent contribution in constitutive Ca²⁺ currents due to TRPM7 was previously suggested [87]. Indeed, it was reported that it can be difficult to detect Ca²⁺ influx mediated by TRPM7 in some cells because its contribution can be small, relative to the large variety of constitutive currents [43, 88]. Our conclusion is that TRPM7 is likely not involved in the large Ca²⁺ influx described in cells expressing Δ F508-CFTR and that the described [Ca²⁺]_i overload in these cells is likely responsible for the altered function of TRPM7. Second, we show here for the first time that Ca²⁺ influx via TRPM7 in cells expressing G551D-CFTR are increased.

We show here, for the first time, that the expression and function of TRPM7 are altered in cells expressing either Δ F508-CFTR or G551D-CFTR (Fig. 14). We also propose



Fig. 14 Summary of results. The table presents previously published information regarding CFTR (*grey*) and the $[Mg^{2+}]_i$ and TRPM7 (*black*) results of this study in order to provide a synthetic view of the correlation between CFTR modulation and our findings

that there is a functional link between TRPM7 and CFTR via decreased $[Mg^{2+}]_i$ and increased Ca^{2+} influx in CF cells. Hypomagnesaemia has been reported as a common feature in CF patients [89]. Mean serum magnesium range in CF patients was shown to be 0.46-1.03 mmol/L whereas the normal range is 0.74-1.1 [89]. This could explain the low levels of $[Mg^{2+}]_i$ that we observed in cells expressing the mutated CFTR. Patients who receive oral magnesium present better clinical symptoms [90]. If we hypothesize that Mg²⁺ supplementation induces a decreased function of TRPM7, this could be in opposition with our results showing that its activation by Naltriben has a positive effect on the function of G551D-CFTR. Nevertheless, the mechanism of action of Mg^{2+} in pulmonology is not fully understood due to a small correlation between serum and intracellular concentrations [90]. For example, [Mg²⁺]_i in erythrocytes, mononuclear cells and granulocytes do not reflect the body's Mg²⁺ store because it is primarily concentrated in muscles and bones [91]. Therefore, we propose that the effect of supplementation may be different among the type of mutation of CFTR, which is linked to variations in the localization and function of TRPM7. Our results

🖄 Springer



Fig. 15 Diagram presenting the results and the effect of Naltriben. The three cells represent WT-CFTR, Δ F508-CFTR and G551D-CFTR experiments with their status related to $[Mg^{2+}]_i$, CFTR and

together with the improvement of the symptoms in CF by Mg^{2+} supplementation also reinforce the poor correlation between serum and intracellular concentrations of Mg^{2+} .

From a pharmacological point of view, we show here that Naltriben modifies the phenotype of CFTR-expressing cells (Fig. 15). Interestingly, the activation of TRPM7 leads to increased G551D-CFTR function; thus, we propose that Naltriben is a new potentiator for this particular mutation.

Acknowledgments We thank the association Gaëtan Salaün and the French foundation "Vaincre la Mucoviscidose" for funding the present work. We also thank Dr Mohamed Keir (Nanion Technology, Germany) for his help. We acknowledge the grant that funds the ability to provide Waixenicin A: U.S. National Institute of Health Grant P20GM 103466.

References

- Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox T, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245:1073–1080
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielinski J, Lok S, Plavsik N, Chou JL, Drumm ML,

Deringer

TRPM7. The effect of Naltriben is shown by *arrows* which indicate that the drug modifies TRPM7 activity and subsequently CFTR function

Ianuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245:1066–1073

- Zielinski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem BS, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC (1991) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. Genomics 10:214–228
- Tabcharani JA, Linsdell P, Hanrahan JW (1997) Halide permeation in wild-type and mutant CFTR chloride channels. J Gen Physiol 110:341–354
- Linsdell P, Tabcharani JA, Rommens JM, Hou YX, Chang XB, Tsui LC, Riordan JR, Hanrahan JW (1997) Permeability of wildtype and mutant CFTR chloride channels to polyatomic anions. J Gen Physiol 110:355–364
- Hasegawa H, Skach W, Baker O, Calayag MC, Lingappa V, Verkman AS (1992) A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. Science 258:1477–1479
- Ballard ST, Spadafora D (2007) Fluid secretion by submucosal glands of the tracheobronchial airways. Respir Physiol Neurobiol 159:271–277
- Riordan JR (2008) CFTR function and prospects for therapy. Annu Rev Biochem 77:701–726
- 9. Rosenstein BJ, Zeitlin PL (1998) Cystic fibrosis. Lancet 351:277-282
- 10. Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. Lancet 361:681-689
- Amaral MD, Farinha CM (2013) Rescuing mutant CFTR: a multi-task approach to a better outcome in treating cystic fibrosis. Curr Pharm Des 19:3497–3508

- Farinha CM, Matos P, Amaral MD (2013) Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane trafficking: not just from the endoplasmic reticulum to the Golgi. FEBS J 280:4396–4406
- Okiyoneda T, Barriere H, Bagdany M, Rabeh WM, Du K, Hohfeld J, Young JC, Lukacs GL (2010) Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. Science 329:805–810
- 14. Melin P, Norez C, Callebaut I, Becq F (2006) The glycine residues G551 and G1349 within the ATP-binding cassette signature motifs play critical roles in the activation and inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by phloxine B. J Membr Biol 208(3):203–212
- Bompadre SG, Sohma Y, Li M, Hwang TC (2007) G551D and G1349D, two CF-associated mutations in the signature sequences of CFTR, exhibit distinct gating defects. J Gen Physiol 129:285–298
- Bompadre SG, Li M, Hwang TC (2008) Mechanism of G551D-CFTR potentiation by a high affinity ATP analog. J Biol Chem 283:5364–5369
- Pasyk S, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE (2009) Direct interaction of a small-molecule modulator with G551D-CFTR, a cystic fibrosis-causing mutation associated with severe disease. Biochem J 418:185–190
- Gadsby DC, Nairn AC (1999) Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. Physiol Rev 79:S77– S107
- Sheppard DN, Welsh MJ (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. Physiol Rev 79:S23–S45
- Cormet-Boyaka E, Di A, Chang SY, Naren AP, Tousson A, Nelson DJ, Kirk KL (2002) CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex. Proc Natl Acad Sci USA 99:12477–12482
- Naren AP, Quick MW, Collawn JF, Nelson DJ, Kirk KL (1998) Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein–protein interactions. Proc Natl Acad Sci USA 95:10972–10977
- Raghuram V, Mak DD, Foskett JK (2001) Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. Proc Natl Acad Sci USA 98:1300–1305
- 23. Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ, Milgram SL (1998) An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. J Biol Chem 273:19797–19801
- Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB, Li M (2000) Accessory protein facilitated CFTR–CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. Cell 103:169–179
- Cheng J, Moyer BD, Milewski M, Loffing J, Ikeda M, Mickle JE, Cutting GR, Li M, Stanton BA, Guggino WB (2002) A Golgiassociated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. J Biol Chem 277:3520–3529
- 26. Trouvé P, Le Drévo MA, Kerbiriou M, Friocourt G, Fichou Y, Gillet D, Férec C (2007) Annexin V is directly involved in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's function. Biochim Biophys Acta 1772(10):1121–1133
- 27. Le Drévo MA, Benz N, Kerbiriou M, Gioux M, Pennec JP, Trouvé P, Férec C (2008) Annexin A5 increases the cell surface expression and the chloride channel function of the ΔF508-cystic fibrosis transmembrane regulator. Biochim Biophys Acta 1782:605–614
- Benz N, Le Hir S, Norez C, Kerbiriou M, Calvez M-L, Becq F, Trouvé P, Férec C (2014) Improvement of chloride transport

defect by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cystic fibrosis epithelial cells. PLoS One 9(2):e88964

- Antigny F, Norez C, Becq F, Vandebrouck C (2011) CFTR and Ca²⁺ signaling in cystic fibrosis. Front Pharmacol 2:67
- Antigny F, Norez C, Cantereau A, Becq F, Vandebrouck C (2008) Abnormal spatial diffusion of Ca²⁺ in F508del-CFTR airway epithelial cells. Respir Res 9:70
- Antigny F, Girardin N, Raveau D, Frieden M, Becq F, Vandebrouck C (2009) Dysfunction of mitochondria Ca²⁺ uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells. Mitochondrion 9(4):232–241
- Antigny F, Norez C, Becq F, Vandebrouck C (2008) Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. Cell Calcium 43(2):175–183
- Norez C, Antigny F, Becq F, Vandebrouck C (2006) Maintaining low Ca²⁺ level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. Traffic 7(5):562–573
- 34. Bargon J, Trapnell BC, Chu CS, Rosenthal ER, Yoshimura K, Guggino WB, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG (1992) Down-regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression by agents that modulate intracellular divalent cations. Mol Cell Biol 12(4):1872–1878
- 35. Li C, Ramjeesingh M, Wang W, Garami E, Hewryk M, Lee D, Rommens JM, Galley K, Bear CE (1996) ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. J Biol Chem 271(45):28463–28468
- Ikuma M, Welsh MJ (2000) Regulation of CFTR Cl2 channel gating by ATP binding and hydrolysis. PNAS 97(15):8675–8680
- Vissera D, Middelbeekb J, van Leeuwenb FN, Jalink K (2014) Function and regulation of the channel-kinase TRPM7 in health and disease. Eur J Cell Biol 93(10–12):455–465
- Nadler MJ, Hermosura M, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A (2001) LTRPC7 is a Mg. ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. Nature 411(6837):590–595
- Penner R, Fleig A (2007) The Mg²⁺ and Mg²⁺-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7. Handb Exp Pharmacol 179:313–328
- Middelbeek J, Clark K, Venselaar H, Huynen MA, van Leeuwen FN (2010) The alpha-kinase family: an exceptional branch on the protein kinase tree. Cell Mol Life Sci 67(6):875–890
- 41. Ryazanova LV, Rondon LJ, Zierler S, Hu Z, Galli J, Yamaguchi TP, Mazur A, Fleig A, Ryazanov AG (2010) TRPM7 is essential for Mg²⁺ homeostasis in mammals. Nat Commun 1:109
- Schmitz C, Perraud AL, Johnson CO, Inabe K, Smith MK, Penner R, Kurosaki T, Fleig A, Scharenberg AM (2003) Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. Cell 114(2):191–200
- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2003) TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. J Gen Physiol 121(1):49–60
- Paravicinia TM, Chubanovb V, Gudermannb T (2012) TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis. Int J Biochem Cell Biol 44(8):1381–1384
- 45. Teng L, Kerbiriou M, Taiya M, Le Hir S, Benz N, Trouvé P, Férec C (2012) Proteomic Identification of Calumenin as a G551D: CFTR associated protein. PLoS One 7(6):e40173
- Baldoli E, Castiglioni S, Maier JA (2013) Regulation and function of TRPM7 in human endothelial cells: TRPM7 as a potential novel regulator of endothelial function. PLoS One 8(3):e59891
- Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr A, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Pholin phenol reagent. J Biol Chem 183:263–275

Deringer

- Yu M, Huang C, Huang Y, Wu X, Li X, Li J (2013) Inhibition of TRPM7 channels prevents proliferation and differentiation of human lung fibroblasts. Inflamm Res 62(11):961–970
- Luo J, Zhu Y, Zhu MX, Hu H (2011) Cell-based calcium assay for medium to high throughput screening of TRP channel functions using FlexStation 3. J Vis Exp 54:e3149. doi:10.3791/3149
- Farre C, Stoelzle S, Haarmann C, George M, Brüggemann A, Fertig N (2007) Automated ion channel screening: patch clamping made easy. Expert Opin Ther Targets 11(4):557–565
- Yang YM, Jung HH, Lee SJ, Choi HJ, Kim MS, Shin DM (2013) TRPM7 is essential for RANKL-induced osteoclastogenesis. Korean J Physiol Pharmacol 17:65–71
- Chokshi R, Matsushita M, Kozak JA (2012) Patch-clamp electrophysiology. Detailed examination of Mg²⁺ and pH sensitivity of human TRPM7 channels. Am J Physiol Cell Physiol 302(7):C1004–C1011
- Chubanov V, Schäfer S, Ferioli S, Gudermann T (2014) Natural and synthetic modulators of the TRPM7 channel. Cells 3:1089–1101
- Hofmann T, Schäfer S, Linseisen M, Sytik L, Gudermann T, Chubanov V (2014) Activation of TRPM7 channels by small molecules under physiological conditions. Pflug Arch: Eur J Physiol 466:2177–2189
- Parnasa M, Petersa M, Dadona D, Leva S, Vertkinb I, Slutskyb I, Minkea B (2009) Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. Cell Calcium 45:300–309
- 56. Chen W, Xu B, Xiao A, Liu L, Fang X, Liu R, Turlova E, Barszczyk A, Zhong X, Sun CLF, Britto LRG, Feng ZP, Sun HS (2015) TRPM7 inhibitor carvacrol protects brain from neonatal hypoxic-ischemic injury. Molecular Brain 8:11
- 57. Szklarcyk D, Franchescini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguez P, Doerks T, Stark M, Muller J, Bork P, Jensen LJ, Von Mering C (2011) The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. Nucl Acids Res 39:D561–D568
- Trouvé P, Kerbiriou M, Teng L, Benz N, Taiya M, Le Hir S, Férec C (2015) G551D-CFTR needs more bound actin than wildtype CFTR to maintain its presence in plasma membranes. Cell Biol Int. doi:10.1002/cbin.10456
- Trapani V, Schweigel-Röntgen M, Cittadini A, Wolf FI (2012) Chapter twenty-two: intracellular magnesium detection by fluorescent indicators. Methods Enzymol 505:421–444
- 60. Kim SJ, Kang HS, Jeong CW, Park SY, Kim IS, Kim NS, Kim SZ, Kwak YG, Kim JS, Quamme GA (2006) Immunosuppressants inhibit hormone-stimulated Mg²⁺ uptake in mouse distal convoluted tubule cells. Biochem Biophys Res Commun 341(3):742–748
- Schmitz C, Deason F, Perraud AL (2007) Molecular components of vertebrate Mg²⁺-homeostasis regulation. Magnes Res 20(1):6–18
- 62. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien Y (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 360:3440–3450
- Goytain A, Quamme GA (2005) Functional characterization of ACDP2 (ancient conserved domain protein), a divalent metal transporter. Physiol Genomics 22:382–389
- Goytain A, Quamme GA (2005) Identification and characterization of a novel mammalian Mg²⁺ transporter with channel-like properties. BMC Genom 6:48
- 65. Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen RJ, Schweigel M (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. EMBO J 22:1235–1244
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J,

McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. Science 285:103–106

- 67. Wabakken T, Rian E, Kveine M, Aasheim HC (2003) The human solute carrier SLC41A1 belongs to a novel eukaryotic subfamily with homology to prokaryotic MgtE Mg²⁺ transporters. Biochem Biophys Res Commun 306:718–724
- Sahni J, Nelson B, Scharenberg AM (2007) SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg²⁺ transporter. Biochem J 401:505–513
- 69. Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG (2004) TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. J Biol Chem 279:19–25
- Oancea E, Wolfe JT, Clapham DE (2006) Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. Circ Res 98(2):245–253
- Simon F, Varela D, Cabello-Verrugio C (2013) Oxidative stressmodulated TRPM ion channels in cell dysfunction and pathological conditions in humans. Cell Signal 25:1614–1624
- 72. Hermosura MC, Nayakanti H, Dorovkov MV, Calderon FR, Ryazanov AG, Haymer DS, Garruto RM (2005) TRPM7 variant shows altered sensitivity to magnesium that may contribute to the pathogenesis of two Guamanian neurodegenerative disorders. Proc Natl Acad Sci USA 102(32):11510–11515
- O'Rourke B (1993) Ion channels as sensors of cellular energy. Mechanisms for modulation by magnesium and nucleotides. Biochem Pharmacol 46(7):1103–1112
- 74. Hennager DJ, Ikuma M, Hoshi T, Welsh MJ (2001) A conditional probability analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gating indicates that ATP has multiple effects during the gating cycle. Proc Natl Acad Sci USA 98:3594–3599
- Hwang TC, Sheppard DN (1999) Molecular pharmacology of the CFTR Cl⁻ channel. Trend Pharmacol Sci 20:448–453
- Zeltwanger S, Wang F, Wang G-T, Gillis KD, Hwang TC (1999) Gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by adenosine triphosphate hydrolysis: quantitative analysis of a cyclic gating scheme. J Gen Physiol 113:541–554
- 77. Zhou SS, Takai A, Okada Y (2002) Regulation of cardiac CFTR Cl⁻ channel activity by a Mg²⁺-dependent protein phosphatase. Pflugers Arch: Eur J Physiol 444:327–334
- 78. Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, Esther CR Jr, Das J, Dokholyan NV, Randell SH, Boucher RC, Gentzsch M (2014) Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of ΔF508 CFTR in cystic fibrosis. Sci Transl Med 6(246):246ra96
- Park HS, Hong C, Kim BJ, So I (2014) The pathophysiologic roles of TRPM7 channel. Korean J Physiol Pharmacol 18(1):15–23
- Himmel B, Nagel G (2004) Protein kinase-independent activation of CFTR by phosphatidylinositol phosphates. EMBO Rep 5(1):85–90
- Kravtsov DV, Caputo C, Collaco A, Hoekstra N, Egan ME, Mooseker MS, Ameen NA (2012) Myosin Ia is required for CFTR brush border membrane trafficking and ion transport in the mouse small intestine. Traffic 13(8):1072–1082
- Vachel L, Norez C, Jayle C, Becq F, Vandebrouck C (2015) The low PLC-δ1 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells induces upregulation of TRPV6 channel activity. Cell Calcium 57(1):38–48
- Sun Y, Selvaraj S, Varma A, Derry S, Sahmoun AE, Singh BB (2013) Increase in serum Ca²⁺/Mg²⁺ ratio promotes proliferation of prostate cancer cells by activating TRPM7 channels. J Biol Chem 288:255–263
- 84. Ribeiro CM, Paradiso AM, Carew MA, Shears SB, Boucher RC (2005) Cystic fibrosis airway epithelial Ca²⁺ signaling: the mechanism for the larger agonist-mediated Ca²⁺ signals in

Deringer

human cystic fibrosis airway epithelia. J Biol Chem 280:10202–10209

- Zierler S, Yao G, Zhang Z, Kuo WC, Pörzgen P, Penner R, Horgen FD, Fleig A (2011) Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesiumdependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. J Biol Chem 286(45):39328–39335
- 86. Visser D, Langeslag M, Kedziora KM, Klarenbeek J, Kamermans A, Horgen FD, Fleig A, van Leeuwen FN, Jalink K (2013) TRPM7 triggers Ca²⁺ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells. Cell Calcium 54:404–415
- Oh HG, Chun YS, Park CS, Kim TW, Park MK, Chung S (2015) Regulation of basal autophagy by transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel. Biochem Biophys Res Commun 463(1–2):7–12
- Wei WL, Sun HS, Olah ME, Sun X, Czerwinska E, Czerwinski W et al (2007) TRPM7 channels in hippocampal neurons detect levels of extracellular divalent cations. Proc Natl Acad Sci USA 104:16323–16328
- Gupta A, Eastham KM, Wrightson N, Spencer DA (2007) Hypomagnesaemia in cystic fibrosis patients referred for lung transplant assessment. J Cyst Fibros 6:360–362
- Gontijo-Amaral C, Guimaraes EV, Camargos P (2012) Oral magnesium supplementation in children with cystic fibrosis improves clinical and functional variables: a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. Am J Clin Nutr 96:50–56
- Nel S, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JÁ, Lewenstam A (2000) Magnesium: an update on physiological, clinical and analytical aspects. Clin Chim Acta 294:1–26

2 Springer

DISCUSSION

I. Résultats et discussion

La sujet phare de ce projet de thèse est l'UPR, une réponse physiologique déclenchée par un stress du RE provoqué par l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière de ce compartiment [84]. Suite au stress du RE, le chef d'orchestre de l'UPR BiP déclenche cette réponse afin 1) d'arrêter la synthèse protéique de la cellule, 2) de réparer ou 3) de dégrader les protéines retenues dans le RE. Si l'homéostasie du RE n'est pas rétablie, l'UPR déclenche l'apoptose. Nous avons choisi d'étudier cette réponse dans un contexte de mucoviscidose [268]. Cette pathologie est due à une mutation du gène *cftr* conduisant à des défauts majeurs de la protéine CFTR. La mutation la plus fréquente, la F508del, est caractérisée par un défaut de repliement du CFTR-F508del qui est alors retenu par le système de contrôle qualité du RE et dégradé par le protéasome. Le CFTR-F508del n'est de ce fait que très peu exporté à la membrane et ne peut donc remplir correctement sa fonction de canal CI⁻ à la surface des cellules épithéliales [269].

Etant donné que le CFTR-F508del est retenu dans le RE, certains auteurs ont émis l'hypothèse que cette rétention serait susceptible de causer un stress du RE et de déclencher l'UPR. Diverses études ont ainsi été menées et plusieurs équipes ont montré que l'UPR est déclenchée dans des cellules exprimant un CFTR muté [242, 243, 270]. Pour le moment, ces études ont surtout montré que seulement quelques protéines de l'UPR telles que BiP, ATF6, XBP1 et CHOP sont surexprimées dans des cellules exprimant un CFTR-F508del. Ainsi, seule la voie ATF6 semble activée dans ces cellules. Pour rappel, ATF6 est une protéine ancrée dans la membrane du RE en conditions normales. En conditions de stress du RE, BiP se dissocie d'ATF6 qui migre alors vers l'appareil de Golgi où elle est clivée successivement par S1P et S2P [135, 136]. La partie active d'ATF6 (ATF6-50 kDa) transite ensuite vers le noyau où elle agit en tant que facteur de transcription de gènes codant des protéines chaperons impliquées dans le repliement des protéines accumulées dans le RE et notamment le chaperon BiP. En parallèle, ATF6 induit l'expression de XBP1 impliqué notamment dans la dégradation des protéines du RE par le système ERAD [140]. Notre équipe a montré en 2007 que la voie ATF6 était déclenchée dans des cellules exprimant un CFTR-F508del [270]. Par ailleurs, selon une étude, ATF6 réprime transcriptionnellement le CFTR en se fixant sur le promoteur de ce dernier [245], faisant d'ATF6 une cible thérapeutique potentielle.

Dans ce projet, nous avons voulu étudier l'implication d'ATF6 dans la mucoviscidose. Une première partie du projet consistait à évaluer l'impact d'une inhibition d'ATF6 sur la fonction et l'exportation membranaire du CFTR. Afin de confirmer cette hypothèse, le premier objectif de ma thèse consistait donc à inhiber la voie ATF6 de l'UPR et évaluer l'impact de cette inhibition sur la fonction et l'exportation vers la membrane du CFTR-F508del dans un modèle de cellules épithéliales bronchiques (CFBE). La première étape de cette étude était de valider notre modèle cellulaire en observant si l'UPR et notamment la voie ATF6 était déclenchée dans des CFBE-F508del en comparaison de CFBE-WT. L'augmentation dans les CFBE-F508del de l'expression de BiP, marqueur du stress du RE et de l'induction de l'UPR, nous a permis de confirmer que l'UPR était induite dans ces cellules. De plus, nous avons mesuré l'expression d'ATF6, que ce soit sa forme inactive (forme totale ATF6-90 kDa) ou active (forme clivée ATF6-50 kDa) afin de déterminer si plus particulièrement la voie ATF6 était active dans nos cellules F508del. Les données ont révélé une augmentation de la forme totale et clivée d'ATF6. Ces résultats sont en accord avec la littérature montrant que BiP et la voie ATF6 sont induites dans des cellules exprimant un CFTR-F508del [242, 243, 270].

Une fois notre modèle d'étude validé pour l'induction de l'UPR et de la voie ATF6, nous nous sommes intéressés à l'inhibition de cette voie. Afin d'inhiber le clivage et donc l'activation d'ATF6, nous avons choisi un inhibiteur des protéases à sérines dont S1P fait partie : l'AEBSF [271].

Nous avons donc testé l'effet de notre inhibiteur sur BiP, ATF6-90 kDa et ATF6-50 kDa. BiP étant en partie induite par la forme clivée d'ATF6, nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition du clivage d'ATF6 allait réduire l'expression du chaperon phare du RE. Les différentes cinétiques effectuées sur des cellules CFBE-F508del traitées à l'AEBSF nous ont permis d'observer que l'expression de BiP était significativement diminuée après quatre heures de traitement. De même pour ATF6-50 kDa dont l'expression diminue après une heure de traitement. Ces résultats valident le fait que l'utilisation de l'AEBSF dans notre modèle cellulaire permet bien une inhibition partielle de la voie ATF6 de l'UPR. Dans d'autres modèles cellulaires, plusieurs études ont obtenu des résultats similaires [245, 272, 273].

Nous avons ensuite voulu évaluer l'impact de l'inhibition de la voie ATF6 sur la fonction et l'exportation à la membrane du CFTR. Les données de *whole patch-clamp* indiquent que le traitement à l'AEBSF induit une augmentation significative des courants Cl⁻ dans des CFBE-F508del. Nous avons obtenu sensiblement les mêmes résultats en utilisant le PF-429242, un inhibiteur plus spécifique de S1P. Ces résultats pourraient s'expliquer par une augmentation de la présence du CFTR-F508del à la membrane. Afin de tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'expression du CFTR à la membrane de cellules *baby hamster kidney* (BHK)-F508del après inhibition de la voie ATF6. Les données de l'immunoprécipitation membranaire ont

permis de montrer qu'après inhibition d'ATF6 par l'AEBSF, l'expression membranaire du CFTR-F508del était augmentée, expliquant de fait l'augmentation de la fonction du CFTR observée en *whole patch-clamp*.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer que l'inhibition d'ATF6 induise l'exportation membranaire du CFTR-F508del. ATF6 réprime transcriptionnellement le CFTR et est en effet impliquée dans l'induction de protéines chargées du repliement et la dégradation des protéines mal repliées dans la lumière du RE. Ainsi, une diminution de l'expression des chaperonnes participant à la rétention du CFTR-F508del ou une diminution du système de dégradation ERAD ou du protéasome peuvent expliquer en partie le mécanisme par lequel l'inhibition d'ATF6 permet la libération du CFTR-F508del du RE se traduisant par une plus grande quantité de CFTR à la membrane. Afin de tenter d'éclaircir ce mécanisme, nous avons procédé à une électrophorèse 2D sur des CFBE-F508del non traitées et traitées à l'AEBSF. Le but de cette expérience étant de permettre l'isolation et l'identification des protéines dont l'expression varie à la suite d'un traitement à l'AEBSF.

Les résultats ont permis d'identifier six protéines. Deux d'entre elles sont des protéines nucléaires (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1* (HNRNRPH1) et *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3* (HNRH3)) et leur expression est diminuée dans les cellules traitées.

A l'inverse, l'expression des quatre autres protéines (GRP75, PDIA3, HSP7C et HSP71) est augmentée dans les cellules traitées.

Les deux protéines dont l'expression est diminuée suite au traitement à l'AEBSF sont des ribonucléoprotéines capables de se lier aux ARN et participant notamment à la prise en charge des pré-ARNm et ARNm dans les processus de maturation-épissage et de transport de ces derniers. De par leur fonction, ces protéines sont retrouvées dans le noyau et dans le cytoplasme [274]. Une étude a montré que l'expression de HNRNRPH1 et HNRH3 était augmentée en même temps que l'expression de BiP [275]. Le fait que l'expression de BiP soit diminuée à la suite de l'inhibition d'ATF6 pourrait expliquer que l'expression de ces protéines soit également diminuée. De par leurs multiples implications dans les processus liés aux pré-ARNm et ARNm dans le fonctionnement général de la cellule, l'hypothèse d'une absence de lien avec ATF6 ou le CFTR est également possible.

Les quatre protéines dont l'expression est retrouvée augmentée à la suite du traitement à l'AEBSF sont des protéines chaperons.

GRP75 est une protéine localisée principalement dans la mitochondrie mais elle est également retrouvée dans le cytosol et le RE. Cette protéine est impliquée dans plusieurs fonctions

cellulaires telles que la réponse au stress, la prolifération et la différenciation cellulaire [276]. GRP75 a été retrouvée surexprimée dans une étude cherchant à identifier les protéines modulées à la suite d'un traitement au 4-PBA, un correcteur du CFTR-F508del [277], ce qui peut expliquer que nous la retrouvions également dans nos cellules traitées. De plus, une autre étude a également montré GRP75 est associée à la forme immature B du CFTR dans le RE [278]. HSP71, localisée dans le cytosol, est une protéine chaperon impliquée dans plusieurs processus liés à la biogénèse protéique tels que le repliement, l'agrégation et la dégradation des protéines. Elle est également inductible par le stress [279]. Le fait que nous retrouvions cette protéine est impliquée dans le transport du CFTR-WT vers le Golgi et dans la dégradation du CFTR-F508del [280].

HSP7C est retrouvée principalement dans le cytoplasme mais également dans le noyau et à la membrane des cellules. Cette protéine est notamment impliquée dans le repliement et le transport des protéines néo-synthétisées ainsi que dans la dégradation des protéines mal repliées [221].

HSC7C est retrouvée dans les protéines faisant partie du premier point de contrôle du CFTR. Curieusement, cette protéine est surexprimée dans nos cellules traitées alors que plusieurs études ont montré que son inhibition était associée à une exportation du CFTR-F508del vers la membrane [235, 281]. D'autres paramètres sont probablement à prendre en compte et une étude approfondie permettrait d'éclaircir l'implication de cette protéine dans notre modèle.

Enfin, PDIA3 est une protéine résidente du RE et impliquée dans le repliement des protéines de par sa fonction d'isomérase [282]. De manière intéressante, la PDIA3 est surexprimée lors d'une exportation du CFTR-F508del vers la membrane à la suite d'un traitement chimique au 4-PBA [278] et à la trichostatine A [241]. Il n'est donc pas étonnant que nous la retrouvions surexprimée également dans nos cellules traitées.

Nous avons par la suite essayé de trouver de possibles interactions entre ces protéines à l'aide de la base de données STRING et nous avons trouvé que toutes ces protéines ont une interaction commune avec l'ubiquitine C (UBC). Cette dernière intervient dans les processus d'ubiquitinylation liés à la dégradation des protéines. De plus, le gène codant l'UBC est induit lors d'un stress [283] et également dans les cellules exprimant un CFTR-F508del [241]. Nous ne savons pas si l'expression de l'UBC est modulée dans nos cellules traitées, mais au vu du rôle central de l'UBC dans la régulation des gènes modificateurs du CFTR [284], il semblerait que de plus amples investigations soient nécessaires.

La seconde partie de mon projet de thèse portait sur l'étude de la $[Mg^{2^+}]_i$ et de TRPM7 dans la mucoviscidose. Plusieurs travaux ont montré l'impact d'une modification de la $[Mg^{2^+}]_i$ sur la transcription, la traduction et la fonction du CFTR [230-232]. Ainsi, des variations de la $[Mg^{2^+}]_i$ pourraient accentuer les effets déjà délétères de la mutation sur le CFTR. Le but de l'étude était donc dans un premier temps de mesurer la $[Mg^{2^+}]_i$ dans un contexte de mucoviscidose.

Pour cela, nous avons travaillé sur des cellules HeLa transfectées de manière stable avec un plasmide codant un CFTR-WT ou F508del. Afin de déterminer plus finement les causes d'une éventuelle différence de $[Mg^{2+}]_i$ selon le CFTR, nous avons également utilisé des cellules exprimant un CFTR-G551D et des cellules non-transfectées (NT). Nous avions donc à notre disposition des cellules n'exprimant pas de CFTR (NT), des cellules exprimant un CFTR à la membrane et fonctionnel (WT), des cellules exprimant un CFTR à la membrane mais non fonctionnel (G551D) et enfin des cellules exprimant un CFTR retenu dans le RE (F508del).

La première étape consistait à mesurer, et ce, pour la première fois, la $[Mg^{2+}]_i$ dans des cellules NT, WT, F508del et G551D. Les mesures ont révélé que la $[Mg^{2+}]_i$ était significativement plus basse dans les HeLa-NT, F508del et G551D en comparaison des HeLa-WT. De plus, la $[Mg^{2+}]_i$ est significativement plus basse dans le HeLa-G551D en comparaison des HeLa-F508del.

Nous avons émis l'hypothèse que ces différences de $[Mg^{2^+}]_i$ observées avaient comme origine une potentielle altération de l'expression, de la localisation et/ou de la fonction du TRPM7 dans ces cellules, ce dernier étant un canal permettant l'entrée de Mg^{2^+} dans la cellule et étant le régulateur principal de la $[Mg^{2^+}]_i$ [285].

Nous avons tout d'abord mesuré l'expression de l'ARNm de TRPM7 par PCR quantitative et n'avons observé aucune différence significative entre nos quatre lignées. Nous avons donc mesuré l'expression de TRPM7 dans des lysats totaux de nos cellules et avons observé que cette expression n'était pas homogène entre nos différents mutants. En effet, les HeLa-WT expriment significativement moins de TRPM7 que les HeLa-NT, F508del et G551D.

Concernant la localisation à la membrane de TRPM7 dans nos mutants, nous avons opté pour une technique de biotinylation qui n'a été réalisée qu'une seule fois et n'a donc pas pu révéler de différences significatives. Bien que cela n'ait pas été quantifié, l'observation de TRPM7 par immuno-fluorescence (IF) tend à montrer que TRPM7 serait localisé à la membrane dans nos HeLa-WT et F508del bien que le signal soit moins fort dans ces dernières. En revanche, les images d'IF n'indiquent pas la présence de TRPM7 à la membrane de HeLa-NT et G551D. En l'absence de résultats statistiques probants, bien que ces résultats soient en accord avec la littérature [286], les observations réalisées quant à la localisation à la membrane de TRPM7 restent difficilement interprétables.

Etant donné que l'expression de TRPM7 est plus forte dans les HeLa-NT, F508del et G551D mais que la $[Mg^{2^+}]_i$ est plus basse comparée aux HeLa-WT, nous avons mis en avant l'hypothèse d'une dysfonction de TRPM7 dans les HeLa-NT, F508del et G551D. Afin de vérifier que notre protocole de *whole patch-clamp* permette bien de mesurer l'activité de TRPM7, nous avons ajouté du Mg²⁺ dans le milieu intracellulaire durant la mesure. TRPM7 est en effet inhibé par le Mg²⁺ intracellulaire et nous avons pu observer cette diminution d'activité de TRPM7, validant ainsi notre protocole de *whole patch-clamp*. C'est sans surprise que les résultats de *whole patch-clamp* nous ont confirmé que l'activité de TRPM7 était diminuée dans les HeLa-F508del et G551D. En revanche, le TRPM7 des HeLa-NT présente une fonction identique à celle des HeLa-WT. Pour les HeLa-WT, F508del et G551D, ces résultats concordent avec la $[Mg^{2^+}]_i$ mesurée en premier lieu. De manière assez logique, la diminution de $[Mg^{2^+}]_i$ observée dans les cellules serait en partie due à une diminution de l'activité de TRPM7.

Enfin, nous avons voulu évaluer l'impact d'une modulation de l'activité de TRPM7 sur l'activité du CFTR. Pour cela, nous avons activé (par du Naltriben) et inhibé (par du Carvacrol) TRPM7 et mesuré l'activité du CFTR. Nous avons tout d'abord mesuré l'activité de TRPM7 en présence de Natrilben ou de Carvacrol afin de nous assurer de l'efficacité de ces derniers, ce qui a été le cas. Concernant les résultats, l'inhibition de TRPM7 ne nous a pas permis d'observer d'effets significatifs sur la fonction de CFTR. Cependant, l'interprétation de ces résultats est à modérer car le Carvacrol inhibe TRPM7 de manière non spécifique en libérant les réserves de $Ca^{2+}du$ RE vers le cytosol. En effet, une $[Ca^{2+}]_i$ élevée inhibe TRPM7 [287]. Le Ca^{2+} étant impliqué en tant que second messager dans de multiples voies de signalisation, l'utilisation du Carvacrol peut conduire à l'apparition de biais dans l'expérimentation. L'activation de TRPM7 par le Naltriben a en revanche montré des résultats significatifs. Dans les HeLa-WT et F508del l'activation de TRPM7 entraîne l'inhibition des courants Cl⁻ liés au CFTR. Dans les HeLa-G551D, le Naltriben a conduit à une augmentation de plus de 800 % des courants Cl⁻ liés au CFTR. Les résultats concernant le CFTR-WT et F508del peuvent s'expliquer par le fait que l'augmentation de l'activité de TRPM7 conduit à une [Mg²⁺]_i trop élevée pour le fonctionnement du CFTR. Une étude a en effet montré qu'une [Mg²⁺]_i trop élevée diminue l'activité du CFTR [288]. De manière surprenante, les résultats obtenus sur les HeLa-G551D à la suite de l'activation de TRPM7 sont opposés à ceux obtenus sur les HeLa-WT et F508del. Une hypothèse serait qu'étant donné que TRPM7 est absent de la membrane dans les HeLaG551D, l'activation de TRPM7 ne serait pas suffisante pour atteindre une $[Mg^{2+}]_i$ assez élevée pour avoir un effet inhibiteur sur le CFTR.

II. Conclusion - Perspectives

En conclusion, les résultats du premier projet de cette thèse confirment qu'ATF6 est bien impliquée dans la répression du CFTR. L'inhibition de cette voie de l'UPR permet en effet une augmentation de la présence du CFTR-F508del à la membrane des cellules traitées.

Une des suites de ce projet pourrait consister à confirmer ces résultats en utilisant un inhibiteur plus spécifique d'ATF6 tel que les *ceapins* développées dans le laboratoire de Peter Walter [185]. L'AEBSF est en effet une molécule agissant sur les protéases à sérines impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires. Ainsi, l'hypothèse que d'autres voies de signalisation ou protéines modulées par l'AEBSF aient un effet sur le CFTR-F508del n'est pas à exclure. Seule une inhibition plus spécifique permettra de confirmer le rôle d'ATF6. Si les *ceapins* s'avèrent efficaces dans notre modèle cellulaire, il serait intéressant de les associer avec un potentiateur tel que l'Ivacaftor et/ou un stabilisateur afin d'observer les effets de l'association de ces trois molécules sur le CFTR-F508del.

A l'inverse, dans le cas où ces molécules ne permettraient pas d'exporter le CFTR-F508del vers la membrane, une des hypothèses envisagées serait que l'AEBSF module l'expression d'une ou plusieurs protéines impliquées dans la rétention ou l'exportation du CFTR. Il s'agirait de s'intéresser dans un premier temps aux protéines identifiées en 2D, mais également à l'UBC qui semble être une piste thérapeutique intéressante.

Une autre perspective envisageable consisterait à tester l'inhibition de la voie ATF6 et observer l'impact sur le CFTR dans des cultures primaires (cellules nasales ou bronches humaines). Etant donné la pertinence du modèle, cela permettrait la validation des données obtenues dans ce projet. Bien que l'idée paraisse séduisante, l'étude de l'UPR dans des cultures primaires de patients atteints de mucoviscidose est difficile de par les biais techniques qu'elle impose. En guise d'exemple, les patients sont régulièrement traités par une multitude de médicaments pouvant influer sur l'UPR. De plus, les tissus des voies aériennes de ces patients présentent régulièrement des épisodes inflammatoires, un autre inducteur de l'UPR. Comme beaucoup d'études sur les cultures primaires, les différences génétiques existant entre différents patients peuvent grandement influer sur les résultats finaux. Un moyen de contourner ce biais serait d'obtenir un grand nombre d'échantillons, ce dont le laboratoire ne dispose pas en ce moment. Par ailleurs, ces différences génétiques peuvent rendre très complexe l'interprétation des résultats dans un modèle que nous ne maîtrisons que très peu pour le moment.

De plus, un projet intéressant serait d'étudier l'impact d'une modulation de l'UPR sur l'inflammation très présente dans la mucoviscidose et participant à la destruction progressive des tissus chez les patients. La relation entre l'UPR et l'inflammation est bilatérale : d'un côté l'inflammation peut déclencher l'UPR et d'une autre côté l'UPR peut déclencher l'inflammation via la voie NF-kB [289]. Il serait intéressant dans un premier temps de caractériser cette inflammation dans un modèle cellulaire le permettant. Dans un second temps, il s'agirait d'observer si la modulation spécifique des différentes voies de l'UPR permettrait une diminution significative de l'inflammation.

En conclusion de la seconde partie, nous avons montré qu'il existe des différences de la $[Mg^{2+}]_i$ entre des lignées exprimant un CFTR sauvage ou muté. De plus, cette étude a confirmé le lien étroit déjà observé entre le CFTR et le Mg^{2+} [230-232]. Notre étude révèle également que ces différences de $[Mg^{2+}]_i$ seraient en partie dues à un défaut d'activité du TRPM7. Quant à ce défaut d'activité, il est fort probable qu'il soit lié à la fonction du CFTR muté. Dans les cellules où la fonction du CFTR est altérée nous avons en effet observé une diminution de l'activité de TRPM7, suggérant qu'il existe un lien entre le CFTR et TRPM7.

De la même manière que le CFTR régule l'activité de ENaC, il est possible que le CFTR régule l'activité de TRPM7. Des expériences de mutagénèse dirigée sur un plasmide codant TRPM7 pourraient permettre de préciser le ou les différents domaines de TRPM7 impliqués dans cette éventuelle interaction. En effet, ces différents plasmides mutés de TRPM7 pourraient être introduits dans nos cellules afin d'observer si l'activation des mutants de TRPM7 permet d'obtenir des résultats similaires. En parallèle, après avoir produit et purifié TRPM7 et le CFTR, des expériences telles que la résonance plasmonique de surface (RPS) ou l'Overlay pourraient aider dans la détermination d'une éventuelle interaction directe entre ces deux canaux ioniques. Afin de valider les résultats obtenus dans cette étude, il serait également nécessaire de réaliser une série d'expériences similaires mais dans un modèle cellulaire comme les CFBE qui s'avère plus pertinent du point de vue du CFTR. Ces cellules sont en effet issues d'un patient homozygote pour la mutation F508del. Elles ont par la suite été transfectées avec un CFTR-F508del recombinant (CFBE-F508del) ou corrigées par transfection d'un CFTR-WT (CFBE-WT).

Il s'agirait également de refaire les expériences d'inhibition de TRPM7 et d'observer l'activité du CFTR mais cette fois-ci en utilisant un inhibiteur plus spécifique tel que la Waixenicine A [290, 291].

Pour finir, nos résultats montrent que l'activation de TRPM7 par le Naltriben dans des cellules exprimant un CFTR-G551D permet de potentialiser l'activité de ce dernier. Cependant, notre étude ne permet pas de savoir si l'augmentation des courants Cl⁻ par le Naltriben est due à

l'activation de TRPM7 ou à un éventuel effet du Naltriben sur le CFTR. Il serait donc intéressant d'éclaircir ce point en mutant par exemple le TRPM7 de manière à ce qu'il ne s'ouvre plus et observer si le Naltriben a toujours le même effet sur l'activité du CFTR. Quoiqu'il en soit, l'utilisation de molécules telles que le Naltriben ouvrent de nouvelles perspectives de piste thérapeutique dans la mucoviscidose. De plus de par ses nombreuses fonctions et son implication dans diverses pathologies, de plus en plus de laboratoire de recherche considèrent ce canal comme une cible thérapeutique majeure. La recherche de modulateur spécifique par screening (chimiothèques) représente un enjeu majeur dans le traitement de plusieurs maladies dans lesquelles TRPM7 est surexprimé et/ou suractivé [292]. Il serait donc intéressant de d'évaluer les effets de la Waixenicine A sur des modèles cellulaires de fibrose.

Concernant la suite de cette étude, il me paraît important de se focaliser sur la relation potentielle entre la $[Mg^{2+}]_i$ et ATF6 par l'intermédiaire de TRPM7. Ce qu'il serait intéressant de faire dans un premier temps, c'est de mesurer l'expression d'ATF6-90 kDa et ATF6-50 kDa dans les mêmes lignées que nous avons utilisées et des CFBE et voir si ces résultats sont corrélés avec l'expression et/ou la fonction de TRPM7. Dans un second temps, il serait intéressant de moduler l'expression et/ou l'activité de TRPM7 afin d'observer de possibles variations des formes d'ATF6 et notamment la forme clivée. Dans le cas où ATF6 serait réellement activée par l'inhibition de TRPM7, l'activation de ce dernier permettrait, via l'inhibition d'ATF6, d'augmenter l'exportation membranaire du CFTR. Si ces expériences se révèlent concluantes, des expériences de 2D couplées à la spectrométrie de masse pourraient aider dans la détermination d'une voie de signalisation éventuelle entre TRPM7 et ATF6.

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Kendrew, J., *Structure and Function in Myoglobin and Other Proteins*. Federation Proceedings, 1959. **18(1)**: p. 740-751.
- 2. Afinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. Science, 1973. **181**(July): p. 223-230.
- 3. Petsko, G.A. and D. Ringe, *Structure et fonction des protéines*, ed. D. Boek. 2008, Bruxelles.
- 4. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, *The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(6): p. 716-31.
- 5. Hoozemans, J.J., J. Stieler, E.S. van Haastert, R. Veerhuis, A.J. Rozemuller, F. Baas, P. Eikelenboom, T. Arendt, and W. Scheper, *The unfolded protein response affects neuronal cell cycle protein expression: implications for Alzheimer's disease pathogenesis.* Exp Gerontol, 2006. **41**(4): p. 380-6.
- 6. Hoozemans, J.J., E.S. van Haastert, D.A. Nijholt, A.J. Rozemuller, P. Eikelenboom, and W. Scheper, *The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1241-51.
- 7. Hoozemans, J.J., R. Veerhuis, E.S. Van Haastert, J.M. Rozemuller, F. Baas, P. Eikelenboom, and W. Scheper, *The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2005. **110**(2): p. 165-72.
- 8. Sammels, E., J.B. Parys, L. Missiaen, H. De Smedt, and G. Bultynck, *Intracellular Ca2+ storage in health and disease: a dynamic equilibrium*. Cell Calcium, 2010. **47**(4): p. 297-314.
- 9. Recasens, A., B. Dehay, J. Bove, I. Carballo-Carbajal, S. Dovero, A. Perez-Villalba, P.O. Fernagut, J. Blesa, A. Parent, C. Perier, I. Farinas, J.A. Obeso, E. Bezard, and M. Vila, *Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys.* Ann Neurol, 2014. **75**(3): p. 351-62.
- 10. Peachey, L.D., *Keith R. Porter*. Biographical Memoirs, 2013.
- 11. Porter, K., A. Claude, and E. Fullam *A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY*. J Exp Med, 1945. **81(3)**: p. 233-46.
- 12. Porter, K. and H.P. Thompson, *Some morphological Features of cultured rat sarcoma. Cells as revealed by the Electron Microscope.* Cancer Research, 1947. 7(July): p. 431-438.
- 13. Porter, K. and H.P. Thompson, *A particulate body associated with epithelial cells cultured from mammary carcinomas of mice of milk-factor strain.* Journal of Experimental Medicine, 1948. **88**(March): p. 15-24.
- 14. Porter, K. and F.L. Kallman, *Significance of cell particulates as seen by electron microscopy*. Ann. New York Acad. Sc., 1952. **54**(July).
- 15. Porter, K., *Observations on a submicroscopic basophilic component of cytoplasm*. Exp. Med., 1953. **97**(December): p. 727-750.
- 16. Shibata, Y., G.K. Voeltz, and T.A. Rapoport, *Rough sheets and smooth tubules*. Cell, 2006. **126**(3): p. 435-9.
- 17. Baumann, O. and B. Walz, *Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains*. Int Rev Cytol, 2001. **205**: p. 149-214.
- 18. Caro, L.G. and G.E. Palade, *Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell.* the journal of cell biology, 1964. **20**(March): p. 473-495.
- Palade, G.E., Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. Science, 1975.
 189(August): p. 347-358.
- 20. Kaufman, R.J., *Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum : coordination of gene transcription and translational controls.* Genes and development, 1999. **13**: p. 1211-1233.

- 21. Imaizumi, K., K. Miyoshi, T. Katayama, T. Yoneda, M. Taniguchi, T. Kudo, and M. Tohyama, *the unfolded protein response and Alzheimer's disease*. biochim Biophys Acta, 2001. **1536**: p. 85-96.
- 22. Cooper, G., *The Cell. A Molecular Approach. 2nd Edition*, Sunderland, Editor. 2000, Sinauer Associates ASM.
- 23. Lodish, H., A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, *Molecular Cell Biology, 4th edition.* 2000, New York: W. H. Freeman. 1184.
- 24. High, S., S.S.L. Andersen, D. Gorlich, E. Hartmann, S. Prehn, T.A. Rapoport, and B. Dobberstein, *Sec61p is adjacent to nascent type I and Type II Signal-Acnhor protein during their membrane integration.* the journal of cell biology, 1993. **121**(May): p. 743-750.
- 25. Mothes, W., S.U. Heinrich, R. Graf, I. Nilsson, G. von Heije, J. Brunner, and T.A. Rapoport, *Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum*. Cell, 1997. **89**(May): p. 523-533.
- 26. Dobson, C.M., *Principles of protein folding, misfolding and aggregation*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 3-16.
- 27. Ellis, R.J. and A.P. Minton, *Join the crowd*. Nature, 2003. **425**(September): p. 27-28.
- 28. Gething, M.-J. and J. Sambrook, *Protein folding in the cell*. Nature, 1992. **355**(January): p. 33-45.
- 29. Karplus, M., *The Levinthal paradox : yesterday and today*. Folding and Design, 1997.
 2 Supplement: p. 69-75.
- 30. Naganathan, A.N. and V. Munoz, *Scaling of folding times with protein size*. J. AM. CHEM. SOC., 2005. **127**: p. 480-481.
- 31. Laskey, R.A., B.M. Honda, A.D. Mills, and J.T. Finch, *Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA*. Nature Cell Biology, 1978. **275**(October): p. 416-420.
- 32. Morange, M., Protéines chaperons. médecine/sciences, 2000. 16(Mai): p. 630-4.
- 33. Tartaglia, G.G., A. Cavalli, and M. Vendruscolo, *Prediction of local structural stabilities of proteins from their amino acid sequences*. Structure, 2007. **15**(2): p. 139-143.
- 34. Mogk, A., C. Schlieker, K.L. Friedrich, H.J. Schonfeld, E. Vierling, and B. Bukau, *Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31033-42.
- 35. Mogk, A., E. Deuerling, S. Vorderwülbecke, E. Vierling, and B. Bukau, *Small heat shock proteins, ClpB ans the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation.* Molecular Microbiology, 2003. **50**: p. 585-595.
- 36. Schlieker, C., B. Bukau, and A. Mogk, *Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in E. coli: implications for their applicability in biotechnology*. Journal of Biotechnology, 2002. **96**: p. 13-21.
- 37. Liberek, K., A. Lewandowska, and S. Zietkiewicz, *Chaperones in control of protein disaggregation*. The EMBO Journal, 2008. **27**(2): p. 328-335.
- Schlesinger, M.J., *Heat Shock Proteins*. The Journal of Biological Chemistry, 1990.
 265(July): p. 12111-12114.
- Hendershot, L.M., J. Wei, J. Gaut, J. Melnick, S. Aviel, and Y. Argon, *Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(May): p. 5269-5274.
- 40. Ellis, R.J., *Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(7): p. 395-401.
- 41. Ellgaard, L. and A. Helenius, *ER quality control: towards an understanding at the molecular level.* Current Opinion in Cell Biology, 2001. **13**: p. 431-437.

- 42. McCaffrey, K. and I. Braakman, *Protein quality control at the endoplasmic reticulum*. Essays Biochem, 2016. **60**(2): p. 227-235.
- 43. Kleizen, B. and I. Braakman, *Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 343-9.
- 44. Sevier, C.S. and C.A. Kaiser, *Formation and transfer of disulphide bonds in living cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(11): p. 836-47.
- 45. Corfield, A., *Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists.* Histochem Cell Biol, 2017. **147**(2): p. 119-147.
- 46. Ferris, S.P., V.K. Kodali, and R.J. Kaufman, *Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases*. Dis Model Mech, 2014. 7(3): p. 331-41.
- 47. Molinari, M., C. Galli, V. Piccaluga, M. Pieren, and P. Paganetti, *Sequential assistance* of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. J Cell Biol, 2002. **158**(2): p. 247-57.
- 48. Hosokawa, N., L.O. Tremblay, Z. You, A. Herscovics, I. Wada, and K. Nagata, *Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I.* J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 26287-94.
- Ninagawa, S., T. Okada, Y. Sumitomo, Y. Kamiya, K. Kato, S. Horimoto, T. Ishikawa, S. Takeda, T. Sakuma, T. Yamamoto, and K. Mori, *EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming step.* J Cell Biol, 2014. 206(3): p. 347-56.
- 50. Roth, J. and C. Zuber, *Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9.* Histochem Cell Biol, 2017. **147**(2): p. 269-284.
- 51. Hosokawa, N., L.O. Tremblay, B. Sleno, Y. Kamiya, I. Wada, K. Nagata, K. Kato, and A. Herscovics, *EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans*. Glycobiology, 2010. **20**(5): p. 567-75.
- 52. Hirao, K., Y. Natsuka, T. Tamura, I. Wada, D. Morito, S. Natsuka, P. Romero, B. Sleno, L.O. Tremblay, A. Herscovics, K. Nagata, and N. Hosokawa, *EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming.* J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9650-8.
- 53. Hosokawa, N., Y. Kamiya, and K. Kato, *The role of MRH domain-containing lectins in ERAD*. Glycobiology, 2010. **20**(6): p. 651-60.
- 54. Hosokawa, N., Y. Kamiya, D. Kamiya, K. Kato, and K. Nagata, *Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans.* J Biol Chem, 2009. **284**(25): p. 17061-8.
- 55. Mueller, B., B.N. Lilley, and H.L. Ploegh, *SEL1L, the homologue of yeast Hrd3p, is involved in protein dislocation from the mammalian ER.* J Cell Biol, 2006. **175**(2): p. 261-70.
- 56. Ninagawa, S., T. Okada, S. Takeda, and K. Mori, *SEL1L is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal proteins but not transmembrane proteins in chicken DT40 cell line.* cell structure and function, 2011. **36**: p. 187-195.
- 57. Christianson, J.C., T.A. Shaler, R.E. Tyler, and R.R. Kopito, *OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 272-82.
- 58. Gillece, P., J.M. Luz, W.J. Lennarz, J. Javier de la Cruz, and K. Römish, *Export of a cyteine-free misfolded secretoryprotein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase*. the journal of cell biology, 1999. **147**(December): p. 1443-1456.

- 59. Yang, H., X. Zhong, P. Ballar, S. Luo, Y. Shen, D.C. Rubinsztein, M.J. Monteiro, and S. Fang, *Ubiquitin ligase Hrd1 enhances the degradation and suppresses the toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin*. Exp Cell Res, 2007. **313**(3): p. 538-50.
- 60. Hosokawa, N. and I. Wada, *Association of the SEL1L protein transmembrane domain with HRD1 ubiquitin ligase regulates ERAD-L*. FEBS J, 2016. **283**(1): p. 157-72.
- 61. Xu, C. and D.T. Ng, *Glycosylation-directed quality control of protein folding*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(12): p. 742-52.
- 62. Fang, S., M. Ferrones, C. Yang, J.P. Jensen, S. Tiwari, and A.M. Weissman, *The tumor* autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. PNAS, 2001. **98**(December): p. 14422-14427.
- 63. Skowronek, M.H., L.M. Hendershot, and I.G. Haas, *The variable domain of nonassembled Ig light chains determines both their half-life and binding to the chaperone BiP.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **95**(February): p. 1574-1578.
- 64. Ushioda, R., J. Hoseki, and K. Nagata, *Glycosylation-independent ERAD pathway* serves as a backup system under ER stress. Mol Biol Cell, 2013. **24**(20): p. 3155-63.
- 65. Ninagawa, S., T. Okada, Y. Sumitomo, S. Horimoto, T. Sugimoto, T. Ishikawa, S. Takeda, T. Yamamoto, T. Suzuki, Y. Kamiya, K. Kato, and K. Mori, *Forcible destruction of severely misfolded mammalian glycoproteins by the non-glycoprotein ERAD pathway.* J Cell Biol, 2015. **211**(4): p. 775-84.
- 66. Ushioda, R. and K. Nagata, *The endoplasmic reticulum-associated degradation and disulfide reductase ERdj5*. Methods Enzymol, 2011. **490**: p. 235-58.
- 67. Shenkman, M., B. Groisman, E. Ron, E. Avezov, L.M. Hendershot, and G.Z. Lederkremer, *A shared endoplasmic reticulum-associated degradation pathway involving the EDEM1 protein for glycosylated and nonglycosylated proteins*. J Biol Chem, 2013. **288**(4): p. 2167-78.
- 68. Romisch, K., *A Case for Sec61 Channel Involvement in ERAD*. Trends Biochem Sci, 2017. **42**(3): p. 171-179.
- 69. Mori, K., *The unfolded protein response: the dawn of a new field*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2015. **91**(9): p. 469-80.
- 70. Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M.-J. Gething, and J. Sambrook, *The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-related protein*. Nature, 1988. **332**(March): p. 462-464.
- 71. Stone, K.R., R.E. Smith, and W.K. Joklik, *Changes in membrane polypeptides that occur when chick embryo fibroblats and NRK cells are transformed with avian sarcoma viruses*. Virology, 1974. **58**: p. 86-100.
- 72. Isaka, T. and M. Yoshida, *Alterations in membrane polypeptides of chick embryo fibroblasts induced by transformation with avian sarcoma viruses.* Virology, 1975. **65**: p. 226-237.
- 73. Shiu, R.P.C., J. Pouyssegur, and I. Pastan, *Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblats.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(September): p. 3840-3844.
- 74. Munro, S. and R.B. Pelham, *An Hsp70-like protein in the ER: identify with the 78 kd glucose-related protein and immunoglobulin heavy chain binding protein.* Cell, 1986. **46**(July): p. 291-300.
- 75. Haas, I.G. and M. Wabl, *Immunoglobulin heavy chain binding protein*. Nature, 1983. **306**(November): p. 387-389.
- 76. Lee, A.S., *Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells.* Trends Biochem Sci, 1987. **12**(January): p. 20-23.

- 77. Normington, K., K. Kohno, Y. Kozutsumi, M.-J. Gething, and J. Sambrook, S. cerevisiae encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. Cell, 1989. **57**(June): p. 1223-1236.
- 78. Lai, E., T. Teodoro, and A. Volchuk, *Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response*. Physiology (Bethesda), 2007. **22**: p. 193-201.
- 79. Schroder, M. and R.J. Kaufman, *ER stress and the unfolded protein response*. Mutat Res, 2005. **569**(1-2): p. 29-63.
- 80. Chong, W.C., M.D. Shastri, and R. Eri, *Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(4).
- 81. Lee, A.S., *The glucose-related proteins: stress induction and clinical applications*. Trends Biochem Sci, 2001. **25**(August): p. 504-510.
- 82. Hetz, C., E. Chevet, and S.A. Oakes, *Proteostasis control by the unfolded protein response*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(7): p. 829-38.
- 83. Fabienne Foufelle and P. Ferré, *La réponse UPR Son rôle physiologique et physiopathologique*. medecine/sciences, 2007. **23**: p. 291-296.
- 84. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*. Science, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
- 85. Yates, A., W. Akanni, M.R. Amode, D. Barrell, K. Billis, D. Carvalho-Silva, C. Cummins, P. Clapham, S. Fitzgerald, L. Gil, C.G. Giron, L. Gordon, T. Hourlier, S.E. Hunt, S.H. Janacek, N. Johnson, T. Juettemann, S. Keenan, I. Lavidas, F.J. Martin, T. Maurel, W. McLaren, D.N. Murphy, R. Nag, M. Nuhn, A. Parker, M. Patricio, M. Pignatelli, M. Rahtz, H.S. Riat, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, A. Vullo, S.P. Wilder, A. Zadissa, E. Birney, J. Harrow, M. Muffato, E. Perry, M. Ruffier, G. Spudich, S.J. Trevanion, F. Cunningham, B.L. Aken, D.R. Zerbino, and P. Flicek, *Ensembl 2016*. Nucleic Acids Res, 2016. 44(D1): p. D710-6.
- 86. Wang, J., J. Lee, D. Liem, and P. Ping, *HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum.* Gene, 2017.
- 87. Wisniewska, M., T. Karlberg, L. Lehtio, I. Johansson, T. Kotenyova, M. Moche, and H. Schuler, *Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78.* PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8625.
- 88. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism.* Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(6): p. 670-84.
- Yang, J., M. Nune, Y. Zong, L. Zhou, and Q. Liu, *Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP.* Structure, 2015. 23(12): p. 2191-203.
- 90. Jin, Y., W. Awad, K. Petrova, and L.M. Hendershot, *Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins bu BiP*. The EMBO Journal, 2008. **27**: p. 2873-2882.
- 91. Lai, C.W., J.H. Otero, L.M. Hendershot, and E. Snapp, *ERdj4 protein is a soluble endoplasmic reticulum (ER) DnaJ family protein that interacts with ER-associated degradation machinery*. J Biol Chem, 2012. **287**(11): p. 7969-78.
- 92. Shen, Y. and L.M. Hendershot, *ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DNAJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates.* Molecular Biology of the Cell, 2005. **16**(January): p. 40-50.
- 93. Shen, Y., L. Meunier, and L.M. Hendershot, *Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress.* J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15947-56.

- 94. Tyson, J.R. and C. Stirling, *LHS1 and SIL1 provide a lumenal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum.* The EMBO Journal, 2000. **19**: p. 6440-6452.
- 95. Chung, K.T., Y. Shen, and L.M. Hendershot, *BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP.* J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47557-63.
- Yan, M., J. Li, and B. Sha, Structural analysis of the Sill-Bip complex reveals the mechanism for Sill to function as a nucleotide-exchange factor. Biochem J, 2011. 438(3): p. 447-55.
- 97. Behnke, J., M.J. Feige, and L.M. Hendershot, *BiP and its nucleotide exchange factors Grp170 and Sil1: mechanisms of action and biological functions.* J Mol Biol, 2015. **427**(7): p. 1589-608.
- 98. NGuyen, T.H., D.T.S. Law, and D.B. Williams, *Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(February): p. 1565-1569.
- 99. Awe, K., C. Lambert, and R. Prange, *Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein.* FEBS Lett, 2008. **582**(21-22): p. 3179-84.
- 100. Simon, S.M., C.S. Peskin, and G.F. Oster, *What drives the translocation of proteins*? Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(May): p. 3770-3774.
- 101. Glick, B.S., Can Hsp70 proteins act as force-generating motors ? Cell, 1995. **70**(January): p. 11-14.
- 102. Hamman, B.D., L.M. Hendershot, and A.E. Johnson, *BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the lumenal end of the translocon pore before and early in translocation.* Cell, 1998. **92**(March): p. 747-758.
- 103. Schauble, N., S. Lang, M. Jung, S. Cappel, S. Schorr, O. Ulucan, J. Linxweiler, J. Dudek, R. Blum, V. Helms, A.W. Paton, J.C. Paton, A. Cavalie, and R. Zimmermann, *BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca2+ leakage from the ER*. EMBO J, 2012. **31**(15): p. 3282-96.
- 104. Lièvremont, J.-P., R. Rizzuto, L.M. Hendershot, and J. Meldolesi, *BiP*, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca2+. The Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(December): p. 30873-30879.
- 105. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, *ER stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(9): p. a004424.
- 106. Ni, M., Y. Zhang, and A.S. Lee, *Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting.* Biochem J, 2011. **434**(2): p. 181-8.
- 107. Gonzalez-Gronow, M., A. Selim, J. Papalas, and S.V. Pizzo, *GRP78: A multifunctional receptor on the cell surface*. ANTIOXYDANTS & REDOX SIGNALING, 2009. **11**: p. 2299-2306.
- 108. Bertolotti, A., Y. Zhang, L.M. Hendershot, H.P. Harding, and R. D., *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein-response*. Nature Cell Biology, 2000. **2**(June): p. 326-332.
- 109. Shen, J., X. Chen, L.M. Hendershot, and R. Prywes, *ER Stress Regulation of ATF6 Localization by dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals*. Developmental Cell, 2002. **3**: p. 99-111.
- 110. Zhu, G. and A.S. Lee, *Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis.* J Cell Physiol, 2015. **230**(7): p. 1413-20.

- 111. Carrara, M., F. Prischi, P.R. Nowak, M.C. Kopp, and M.M. Ali, *Noncanonical binding* of *BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling.* Elife, 2015. **4**.
- 112. Kimata, Y., D. Oikawa, Y. Shimizu, Y. Ishiwata-Kimata, and K. Kohno, *A role for BiP* as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. J Cell Biol, 2004. **167**(3): p. 445-56.
- Credle, J., J.S. Finer-Moore, F.R. Papa, R.M. Stroud, and P. Walter, *On the mecanism of sensing unfolded protein in the ensoplasmic reticulum*. PNAS, 2005. 102(December): p. 18773-18784.
- 114. Higa, A., S. Taouji, S. Lhomond, D. Jensen, M.E. Fernandez-Zapico, J.C. Simpson, J.-M. Pasquet, R. Schekman, and E. Chevet, *Endoplasmic reticulum stress-activated* transcription factor ATF6 requires the disulfide isomeras PDIA5 to modulate chemoresistance. Molecular and Cellular Biology, 2014. 34(May): p. 1839-1849.
- 115. Cox, J.S., C.E. Shamu, and P. Walter, *Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase*. Cell, 1993. **73**(June): p. 1197-1206.
- 116. Mori, K., W. Ma, M.-J. Gething, and J. Sambrook, *A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activityis required for signaling frome the ER to the nucleus.* Cell, 1993. **74**(August): p. 743-756.
- 117. Tirasophon, W., A.A. Welihinda, and R.J. Kaufman, A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. Genes and development, 1998.
 12: p. 1812-1824.
- 118. Zhou, J., C. Yin Liu, S. Hoon Back, R.L. Clark, D. Peisach, Z. Xu, and R.J. Kaufman, *The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response.* PNAS, 2006. 103(September): p. 14343-14348.
- 119. Tirasophon, W., K. Lee, B. Callaghan, A.A. Welihinda, and R.J. Kaufman, *The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response.* Genes and development, 2000. **14**: p. 2725-2736.
- 120. Calfon, M., H. Zeng, F. Urano, J.H. Till, S.R. Hubbard, H.P. Harding, S.G. Clark, and D. Ron, *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(January): p. 92-96.
- 121. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response.* Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(21): p. 7448-7459.
- 122. Oyadomari, S. and K. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*. Cell Death Differ, 2004. **11**: p. 381-389.
- 123. Yoshida, H., M. Oku, M. Suzuki, and K. Mori, *pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA* negatively regulates unfolded protein response activator *pXBP1(S)* in mammalian ER stress response. J Cell Biol, 2006. **172**(4): p. 565-75.
- 124. Harding, H.P., Y. Zhang, and D. Ron, *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase*. Nature, 1999. **397**(January): p. 271-274.
- 125. Harding, H.P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron, *PERK is essential for translational regulation and cell survival during unfolded protein response*. molecular Cell, 2000. **5**(May): p. 897-904.
- 126. Scheuner, D., B. Song, E. McEwen, C. Liu, R. Laybutt, P. Gillespie, T. Saunders, S. Bonner-Weir, and R.J. Kaufman, *Translational Control Is Required for the Unfolded Protein Response and In Vivo Glucose Homeostasis*. Molecular Cell, 2001. 7(June): p. 1165-1176.

- 127. Vattem, K.M. and R.C. Wek, *Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells.* PNAS, 2004. **101**(August): p. 11269-11274.
- 128. Harding, H.P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P.D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D.F. Stojdl, J.C. Bell, T. Hettmann, J.M. Leiden, and D. Ron, An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. Molecular Cell, 2003. 11(3): p. 619-633.
- 129. Ma, Y., J.W. Brewer, J. Alan Diehl, and L.M. Hendershot, *Two Distinct Stress Signaling Pathways Converge Upon the CHOP Promoter During the Mammalian Unfolded Protein Response.* Journal of Molecular Biology, 2002. **318**(5): p. 1351-1365.
- Ma, Y. and L.M. Hendershot, *Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2003. 278(37): p. 34864-73.
- 131. Marciniak, S.J., C.Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H.P. Harding, and D. Ron, *CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum*. Genes and development, 2004. **18**: p. 3066-3077.
- 132. Novoa, I., H. Zeng, H.P. Harding, and D. Ron, *Feedback inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2a.* the journal of cell biology, 2001. **153**(May): p. 1011-1021.
- 133. Jousse, C., S. Oyadomari, I. Novoa, P. Lu, Y. Zhang, H.P. Harding, and D. Ron, *Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells.* J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 767-75.
- 134. Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori, *Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins*. The Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(December): p. 33741-33749.
- 135. Kyosuke Haze, Hiderou Yoshida, Hideki Yanagi, Takashi Yura, and K. Mori, Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. Molecular Biology of the Cell, 1999. **10**: p. 3787-3799.
- 136. Jin Ye, Robert B. Rawson, Ryutaro Komuro, Xi Chen, Utpal P. Dave', Ron Prywes, Michael S. Brown, and J.L. Goldstein*[‡], *ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs*. Molecular Cell, 2000. 6: p. 1355-1364.
- 137. Shen, J. and R. 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.* J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 43046-51.
- 138. Schindler, A.J. and R. Schekman, *In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles*. PNAS, 2009. **106**(October): p. 17775-17780.
- 139. Adachi, Y., K. Yamamoto, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, and K. Mori, *ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum.* cell structure and function, 2008. **33**: p. 75-89.
- 140. Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, and K. Mori, *XBP1 mRNA Is Induced* by *ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor*. Cell, 2001. **107**(December): p. 881-891.
- 141. Okada, T., H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi, and K. Mori, *Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response*. Biochem J, 2002. **366**: p. 585-594.

- 142. Thuerauf, D.J., M. Marcinko, P.J. Belmont, and C.C. Glembotski, *Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22865-78.
- Shen, J., E.L. Snapp, J. Lippincott-Schwartz, and R. Prywes, *Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response*. Mol Cell Biol, 2005. 25(3): p. 921-32.
- 144. Sato, Y., S. Nadanaka, T. Okada, K. Okawa, and K. Mori, *Luminal domain of ATF6* alone is sufficient for sensing endoplasmic reticulum stress and subsequent transport to the Golgi appartus. cell structure and function, 2011. **36**: p. 35-47.
- 145. Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H.P. Harding, and D. Ron, *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. Science, 2000. **287**(January): p. 664-666.
- 146. Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama, and M. Tohyama, Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. J Biol Chem, 2001. 276(17): p. 13935-40.
- 147. Yamaguchi, H. and H.G. Wang, *CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45495-502.
- 148. Schonthal, A.H., *Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy*. Scientifica (Cairo), 2012. 2012: p. 857516.
- 149. Puthalakath, H., L.A. O'Reilly, P. Gunn, L. Lee, P.N. Kelly, N.D. Huntington, P.D. Hughes, E.M. Michalak, J. McKimm-Breschkin, N. Motoyama, T. Gotoh, S. Akira, P. Bouillet, and A. Strasser, *ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim.* Cell, 2007. **129**(7): p. 1337-49.
- Oakes, S.A., L. Scorrano, J. Opferman, M.C. Bassik, M. Nishino, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer, *Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum*. PNAS, 2004. 102(January): p. 105-110.
- 151. Bajaj, G. and R.K. Sharma, *TNF-alpha-mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(4): p. 1558-64.
- 152. Kerbiriou, M., L. Teng, N. Benz, P. Trouve, and C. Ferec, *The calpain, caspase 12, caspase 3 cascade leading to apoptosis is altered in F508del-CFTR expressing cells.* PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8436.
- 153. Oakes, S.A. and F.R. Papa, *The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology*. Annu Rev Pathol, 2015. **10**: p. 173-94.
- 154. Wang, S. and R.J. Kaufman, *The impact of the unfolded protein response on human disease*. J Cell Biol, 2012. **197**(7): p. 857-67.
- 155. Moenner, M., O. Pluquet, M. Bouchecareilh, and E. Chevet, *Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10631-4.
- 156. Casas, C., *GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 177.
- 157. Scheper, W. and J.J. Hoozemans, *The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective.* Acta Neuropathol, 2015. **130**(3): p. 315-31.
- 158. Liu, M. and S.C. Dudley, Jr., *Role for the Unfolded Protein Response in Heart Disease and Cardiac Arrhythmias.* Int J Mol Sci, 2015. **17**(1).
- 159. Grootjans, J., A. Kaser, R.J. Kaufman, and R.S. Blumberg, *The unfolded protein response in immunity and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(8): p. 469-84.
- 160. Perera, N., J.L. Miller, and N. Zitzmann, *The role of the unfolded protein response in dengue virus pathogenesis*. Cell Microbiol, 2017. **19**(5).

- 161. Sarvani, C., D. Sireesh, and K.M. Ramkumar, *Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases*. Pharmacol Res, 2017. **119**: p. 412-421.
- 162. Marcinak, S.J. and D. Ron, *The unfolded protein response in lung disease*. Proc Am Thorac Soc, 2010. 7(6): p. 356-62.
- 163. Kelsen, S.G., *The Unfolded Protein Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Ann Am Thorac Soc, 2016. **13 Suppl 2**: p. S138-45.
- 164. Park, S.W. and U. Ozcan, *Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(3): p. 351-73.
- 165. Ojha, R. and R.K. Amaravadi, *Targeting the unfolded protein response in cancer*. Pharmacol Res, 2017. **120**: p. 258-266.
- 166. Schwarze, S. and V. Rangnekar, *Targeting plasma membrane GRP78 for cancer growth inhibition*. Cancer Biology & Therapy, 2014. **9**(2): p. 153-155.
- Xiao, G., T.-Z. Chung, H. Yung Pyun, R.E. Fine, and R.J. Johnson, *KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells*. Molecular Brain Research, 1999. 72: p. 121-128.
- 168. Zhang, Y., R. Liu, M. Ni, P. Gill, and A.S. Lee, *Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP.* J Biol Chem, 2010. **285**(20): p. 15065-75.
- 169. Booth, L., J.L. Roberts, and P. Dent, *HSPA5/Dna K may be a useful target for human disease therapies*. DNA Cell Biol, 2015. **34**(3): p. 153-8.
- 170. Schuit, F.C., P.A. In 'T Veld, and D.G. Pipeleers, *Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependant recruitment of pancreatic beta cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(June): p. 3865-3869.
- 171. Kataoka, H.U. and H. Noguchi, *ER Stress and beta-Cell Pathogenesis of Type 1 and Type 2 Diabetes and Islet Transplantation*. Cell Med, 2013. **5**(2-3): p. 53-7.
- 172. Boden, G., X. Duan, C. Homko, E.J. Molina, W. Song, O. Perez, P. Cheung, and S. Merali, *Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals.* Diabetes, 2008. **57**(9): p. 2438-44.
- 173. Fonseca, S.G., J. Gromada, and F. Urano, *Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(7): p. 266-74.
- 174. Lipson, K.L., S.G. Fonseca, S. Ishigaki, L.X. Nguyen, E. Foss, R. Bortell, A.A. Rossini, and F. Urano, *Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1*. Cell Metab, 2006. **4**(3): p. 245-54.
- 175. Liang, L., J. Chen, L. Zhan, X. Lu, X. Sun, H. Sui, L. Zheng, H. Xiang, and F. Zhang, *Endoplasmic reticulum stress impairs insulin receptor signaling in the brains of obese rats.* PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126384.
- 176. Ji, Y., Z. Zhao, T. Cai, P. Yang, and M. Cheng, *Liraglutide alleviates diabetic cardiomyopathy by blocking CHOP-triggered apoptosis via the inhibition of the IRE-alpha pathway.* Mol Med Rep, 2014. **9**(4): p. 1254-8.
- Julier, C. and M. Nicolino, *Wolcott-Rallison syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2010. 5: p. 29.
- 178. Hoozemans, J.J., E.S. van Haastert, D.A. Nijholt, A.J. Rozemuller, and W. Scheper, *Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease*. Neurodegener Dis, 2012. **10**(1-4): p. 212-5.
- 179. Rozpedek, W., L. Marklewicz, D.J. A., D. Pytel, and I. Majsterek, *Unfolded protein* response and PERK kinase as a new therapeutic target in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Curr. Med. Chem, 2015. 22: p. 3169-3184.
- 180. Radford, H., J.A. Moreno, N. Verity, M. Halliday, and G.R. Mallucci, *PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia.* Acta Neuropathol, 2015. **130**(5): p. 633-42.

- 181. Dadey, D.Y.A., V. Kapoor, A. Khudanyan, F. Urano, A.H. Kim, D. Thotala, and D.E. Hallahan, *ATF6 pathway of te ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma*. Oncotarget, 2015. 7(2): p. 2080-2092.
- 182. Galindo, I., B. Hernaez, R. Munoz-Moreno, M.A. Cuesta-Geijo, I. Dalmau-Mena, and C. Alonso, *The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e341.
- 183. Jin, J.K., E.A. Blackwood, K. Azizi, D.J. Thuerauf, A.G. Fahem, C. Hofmann, R.J. Kaufman, S. Doroudgar, and C.C. Glembotski, ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart. Circ Res, 2017. 120(5): p. 862-875.
- 184. Plate, L., R.J. Paxman, R.L. Wiseman, and J.W. Kelly, *Modulating protein quality control.* Elife, 2016. **5**: p. 1-4.
- 185. Gallagher, C.M., C. Garri, E.L. Cain, K.K. Ang, C.G. Wilson, S. Chen, B.R. Hearn, P. Jaishankar, A. Aranda-Diaz, M.R. Arkin, A.R. Renslo, and P. Walter, *Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6alpha branch*. Elife, 2016. **5**.
- 186. Ortega, A., E. Rosello-Lleti, E. Tarazon, C. Gil-Cayuela, F. Lago, J.R. Gonzalez-Juanatey, L. Martinez-Dolz, M. Portoles, and M. Rivera, *TRPM7 is down-regulated in both left atria and left ventricle of ischaemic cardiomyopathy patients and highly related to changes in ventricular function.* ESC Heart Fail, 2016. **3**(3): p. 220-224.
- 187. Paravicini, T.M., V. Chubanov, and T. Gudermann, *TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(8): p. 1381-4.
- 188. Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurosaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizhu, I. K., K. Imoto, and Y. Mori, *Molecular and Functional Characterization of a Novel Mouse Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP7*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(September): p. 27359-27370.
- 189. Park, H.S., C. Hong, B.J. Kim, and I. So, *The Pathophysiologic Roles of TRPM7 Channel*. Korean J Physiol Pharmacol, 2014. **18**(1): p. 15-23.
- 190. Oh, H.G., Y.S. Chun, C.S. Park, T.W. Kim, M.K. Park, and S. Chung, *Regulation of basal autophagy by transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channel.* Biochem Biophys Res Commun, 2015. 463(1-2): p. 7-12.
- 191. Turlova, E., C.Y.J. Bae, M. Deurloo, W. Chen, A. Barszczyk, F.D. Horgen, A. Fleig, Z.-P. Feng, and H.-S. Sun, *TRPM7 Regulates Axonal Outgrowth and Maturation of Primary Hippocampal Neurons*. Mol Neurobiol, 2014.
- 192. Guilbert, A., M. Gautier, I. Dhennin-Duthille, P. Rybarczyk, J. Sahni, H. Sevestre, A.M. Scharenberg, and H. Ouadid-Ahidouch, *Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain.* Eur J Cancer, 2013. **49**(17): p. 3694-707.
- 193. Visser, D., M. Langeslag, K.M. Kedziora, J. Klarenbeek, A. Kamermans, F.D. Horgen, A. Fleig, F.N. van Leeuwen, and K. Jalink, *TRPM7 triggers Ca2+ sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells*. Cell Calcium, 2013. **54**(6): p. 404-15.
- 194. Zhu, Y., R. Men, M. Wen, X. Hu, X. Liu, and L. Yang, *Blockage of TRPM7 channel induces hepatic stellate cell death through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis.* Life Sci, 2014. **94**(1): p. 37-44.
- 195. Li, X., X. Wang, Y. Wang, X. Li, C. Huang, and J. Li, *Inhibition of transient receptor* potential melastatin 7 (TRPM7) channel induces RA FLSs apoptosis through endoplasmic reticulum (ER) stress. Clin Rheumatol, 2014. **33**(11): p. 1565-74.
- 196. Wiuf, C., *DO deltaF508del heterozygotes have a selective advantage*? genet. res., camb., 2001. **78**: p. 41-47.

- 197. Quinton, P.M., *Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective*. Physiological reviews, 1999. **79**(January): p. S3-S22.
- 198. Lobitz, S. and E. Velleuer, *Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades*. Nat rev cancer, 2006. **6**(November): p. 893-898.
- 199. Andersen, D.H., *Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study.* Am J Dis Child., 1938. **56**: p. 344-399.
- 200. Andersen, D.H., *Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology*. Am J Dis Child., 1946. **72**: p. 62-80.
- 201. Gibson, L.E. and R.E. Cook, A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics, 1959. 23(3): p. 545-549.
- 202. di Sant'Agnese, P.A., R.C. Darling, G.A. Perera, and E. Shea, *Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas clinical significance and relationship to the disease*. Pediatrics, 1953. **12(5)**: p. 549-563.
- 203. Quinton, P.M., *Chloride impermeability in cystic fibrosis*. Nature, 1983. **301**(February): p. 421-422.
- 204. Knowles, M.R., J. Gatzy, and R.C. Boucher, *Increased bioelectric potential difference* across repiratory epithelia in cystic fibrosis. N Engl J Med, 1981. **305**(Dec): p. 1489-1495.
- 205. Tsui, L.C., M. Buchwald, D. Barker, J.C. Braman, R. Knowlton, J.W. Schumm, H. Eiberg, J. Mohr, D. Kennedy, N. Plavsic, M. Zsiga, D. Marklewicz, G. Akots, V. Brown, C. Helms, T. Gravius, C. Parker, K. Rediker, and H. Donis-Keller, *Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker*. Science, 1985. 230(November): p. 1054-1057.
- 206. Riordan, J.R., J.M. Rommens, B.-S. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.-L. Chou, M.L. Drumm, M.C. Iannuzzi, F.S. Collins, and L.C. Tsui, *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA*. Science, 1989. 245(September): p. 1066-1073.
- 207. Kerem, B.-S., J.M. Rommens, J.A. Buchanan, D. Marklewicz, T.K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L.C. Tsui, *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis.* Science, 1989. **245**(4922): p. 1073-1080.
- 208. Rommens, J.M., M.C. Iannuzzi, B.-S. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, M. Zsiga, M. Buchwald, J.R. Riordan, L.C. Tsui, and F.S. Collins, *Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping.* Science, 1989. 245(September): p. 1059-1065.
- 209. Scotet, V., I. Dugueperoux, P. Saliou, G. Rault, M. Roussey, M.P. Audrezet, and C. Ferec, *Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France.* Orphanet J Rare Dis, 2012. 7: p. 14.
- 210. Farrell, P.M., *The prevalence of cystic fibrosis in the European Union*. J Cyst Fibros, 2008. **7**(5): p. 450-3.
- 211. Wilkens, S., *Structure and mechanism of ABC transporters*. F1000Prime Reports, 2015. 7(February): p. 1-9.
- Serohijos, A.W.R., T. Hegedus, A.A. Aleksandrov, L. He, L. Cui, N.V. Dokholyan, and J.R. Riordan, *Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function*. PNAS, 2008. 105(March): p. 3256-3261.
- 213. Mornon, J.P., B. Hoffmann, S. Jonic, P. Lehn, and I. Callebaut, *Full-open and closed CFTR channels, with lateral tunnels from the cytoplasm and an alternative position of the F508 region, as revealed by molecular dynamics.* Cell Mol Life Sci, 2015. **72**: p. 1377-1403.

- 214. Cant, N., N. Pollock, and R.C. Ford, *CFTR structure and cystic fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **52**: p. 15-25.
- 215. Hwang, T.C. and K.L. Kirk, *The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(1): p. a009498.
- 216. Moran, O., *The gating of the CFTR channel*. Cell Mol Life Sci, 2017. 74(1): p. 85-92.
- 217. Zielenski, J., R. Rozmahel, D. Bozon, B.-S. Kerem, Z. Grzelczak, J.R. Riordan, J.M. Rommens, and L.C. Tsui, *Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene.* Genomics, 1991. **10**: p. 214-228.
- 218. Lu, Y., X. Xiong, A. Helm, K. Kimani, A. Bragin, and W.R. Skach, Co- and Posttranslational Translocation Mechanisms Direct Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator N Terminus Transmembrane Assembly. The Journal of Biological Chemistry, 1998. 273(January): p. 568-576.
- 219. Kim, S.J. and W.R. Skach, *Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 201.
- 220. Riordan, J.R., A.L. Lachapelle, J. Marshall, E.A. Higgins, and S.H. Cheng, *Characterization of the oligosaccharide structures associated with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.* Glycobiology, 2000. **10**: p. 1225-1233.
- 221. Stricher, F., C. Macri, M. Ruff, and S. Muller, *HSPA8/HSC70 chaperone protein:* structure, function, and chemical targeting. Autophagy, 2013. **9**(12): p. 1937-54.
- 222. Murata, S., T. Chiba, and K. Tanaka, *CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2003. **35**(5): p. 572-578.
- 223. Pranke, I.M. and I. Sermet-Gaudelus, *Biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.* Int J Biochem Cell Biol, 2014. **52**: p. 26-38.
- 224. Wang, X., J. Venable, P. LaPointe, D.M. Hutt, A.V. Koulov, J. Coppinger, C. Gurkan, W. Kellner, J. Matteson, H. Plutner, J.R. Riordan, J.W. Kelly, J.R. Yates, 3rd, and W.E. Balch, *Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis.* Cell, 2006. **127**(4): p. 803-15.
- 225. Farinha, C.M. and S. Canato, *From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(1): p. 39-55.
- 226. Riordan, J.R., *CFTR function and prospects for therapy*. Annu Rev Biochem, 2008. 77: p. 701-26.
- 227. Quinton, P.M., *Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis.* The Lancet, 2008. **372**(9636): p. 415-417.
- 228. Ehre, C., C. Ridley, and D.J. Thornton, *Cystic fibrosis: an inherited disease affecting mucin-producing organs.* Int J Biochem Cell Biol, 2014. **52**: p. 136-45.
- 229. Chandler, J.D. and B.J. Day, *Biochemical mechanisms and therapeutic potential of pseudohalide thiocyanate in human health.* Free Radic Res, 2015. **49**(6): p. 695-710.
- 230. Ikuma, M. and M.J. Welsh, *Regulation of CFTR Cl- Channel gating by ATP binding and hydrolysis.* PNAS, 2000. **97**(Kuly): p. 8675-8680.
- 231. Schultz, B.D., R.J. Bridges, and R.A. Frizzel, *lack of conventional ATPase properties in CFTR chloride channel gating*. J. Membrane Biol, 1996. **151**: p. 63-75.
- 232. Bargon, J., B.C. Trapnell, C.-S. Chu, E.R. Rosenthal, K. Yoshimura, W.B. Guggino, W. Dalemans, A. Pavirani, J.-P. Lecoq, and R.G. Crystal, *Down-Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Expression by Agents That Modulate IntracellularDivalentCations*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(April): p. 1872-1878.
- 233. Kunzelmann, K., *CFTR: interacting with everything*? News Physiol. Sci., 2001. **16**(August): p. 167-170.
- 234. Kunzelmann, K. and A. Mehta, *CFTR: a hub for kinases and crosstalk of cAMP and Ca2+*. FEBS J, 2013. **280**(18): p. 4417-29.

- 235. Chanoux, R.A. and R.C. Rubenstein, *Molecular Chaperones as Targets to Circumvent the CFTR Defect in Cystic Fibrosis.* Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 137.
- 236. Rubenstein, R.C. and P.L. Zeitlin, *Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DF508-CFTR*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**: p. C259-C267.
- 237. Norez, C., S. Noel, M. Wilke, M. Bijvelds, H. Jorna, P. Melin, H. DeJonge, and F. Becq, *Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat.* FEBS Lett, 2006. **580**(8): p. 2081-6.
- 238. Le Henaff, C., E. Hay, F. Velard, C. Marty, O. Tabary, P.J. Marie, and J.P. Jacquot, *Enhanced F508del-CFTR channel activity ameliorates bone pathology in murine cystic fibrosis.* Am J Pathol, 2014. **184**(4): p. 1132-41.
- 239. Nanua, S., U. Sajjan, S. Keshavjee, and M.B. Hershenson, *Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(1): p. 135-43.
- 240. Blohmke, C.J., M.L. Mayer, A.C. Tang, A.F. Hirschfeld, C.D. Fjell, M.A. Sze, R. Falsafi, S. Wang, K. Hsu, M.A. Chilvers, J.C. Hogg, R.E. Hancock, and S.E. Turvey, Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses. J Immunol, 2012. 189(11): p. 5467-75.
- 241. Pankow, S., C. Bamberger, D. Calzolari, S. Martinez-Bartolome, M. Lavallee-Adam, W.E. Balch, and J.R. Yates, 3rd, *F508 CFTR interactome remodelling promotes rescue of cystic fibrosis*. Nature, 2015. **528**(7583): p. 510-6.
- 242. Gomes-Alves, P., F. Couto, C. Pesquita, A.V. Coelho, and D. Penque, *Rescue of* F508del-CFTR by RXR motif inactivation triggers proteome modulation associated with the unfolded protein response. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(4): p. 856-65.
- 243. Bartoszewski, R., A. Rab, A. Jurkuvenaite, M. Mazur, J. Wakefield, J.F. Collawn, and Z. Bebok, *Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(4): p. 448-57.
- 244. Rab, A., R. Bartoszewski, A. Jurkuvenaite, J. Wakefield, J.F. Collawn, and Z. Bebok, *Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(2): p. C756-66.
- 245. Bartoszewski, R., A. Rab, G. Twitty, L. Stevenson, J. Fortenberry, A. Piotrowski, J.P. Dumanski, and Z. Bebok, *The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response*. J Biol Chem, 2008. 283(18): p. 12154-65.
- 246. Ward, C.L., S. Omura, and R.R. Kopito, *Degradation of CFTR by the Ubiquitin-Proteasome pathway.* Cell, 1995. **83**(October): p. 121-127.
- 247. Rowntree, R.K. and A. Harris, *The phenotypic consequences of CFTR mutations*. Annals of Human Genetics, 2003. **67**: p. 471-485.
- 248. Ferec, C. and G.R. Cutting, *Assessing the Disease-Liability of Mutations in CFTR*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(12): p. a009480.
- 249. Martin, C., C. Hamard, R. Kanaan, V. Boussaud, D. Grenet, M. Abely, D. Hubert, A. Munck, L. Lemonnier, and P.R. Burgel, *Causes of death in French cystic fibrosis patients: The need for improvement in transplantation referral strategies!* J Cyst Fibros, 2016. **15**(2): p. 204-12.
- 250. Lopes-Pacheco, M., *CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis.* Front Pharmacol, 2016. 7: p. 275.
- 251. Flume, P.A., *Pulmonary complications of cystic fibrosis*. Respiratory Care, 2009.
 54(May): p. 618-627.
- 252. Ratjen, F., S.C. Bell, S.M. Rowe, C.H. Goss, A.L. Quittner, and A. Bush, *Cystic fibrosis*. Nat Rev Dis Primers, 2015. 1: p. 15010.
- 253. Sathe, M.N. and A.J. Freeman, *Gastrointestinal, Pancreatic, and Hepatobiliary Manifestations of Cystic Fibrosis.* Pediatr Clin North Am, 2016. **63**(4): p. 679-98.
- 254. Radlovic, N., *Cystic fibrosis*. Srpski arhiv za celokupno lekarstvo, 2012. **140**(3-4): p. 244-249.
- 255. Nick, J.A. and D.P. Nichols, *Diagnosis of Adult Patients with Cystic Fibrosis*. Clin Chest Med, 2016. **37**(1): p. 47-57.
- 256. Gibson-Corley, K.N., D.K. Meyerholz, and J.F. Engelhardt, *Pancreatic pathophysiology in cystic fibrosis*. J Pathol, 2016. **238**(2): p. 311-20.
- 257. Kobelska-Dubiel, N., B. Klincewicz, and W. Cichy, *Liver disease in cystic fibrosis*. Prz Gastroenterol, 2014. **9**(3): p. 136-41.
- 258. Kelly, T. and J. Buxbaum, *Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis*. Dig Dis Sci, 2015. **60**(7): p. 1903-13.
- Lissens, W., B. Mercier, H. Tournaye, M. Bonduelle, C. Ferec, S. Seneca, P. Devroey, S. Silber, A. Van steirteghem, and I. Liebaers, *Cystic fibrosis infertility caused by genital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities*. Hum Reprod, 1996. 11(Supplement 4): p. 55-80.
- 260. Tildy, B.E. and D.F. Rogers, *Therapeutic options for hydrating airway mucus in cystic fibrosis*. Pharmacology, 2015. **95**(3-4): p. 117-32.
- 261. Clancy, J.P., S.M. Rowe, F.J. Accurso, M.L. Aitken, R.S. Amin, M.A. Ashlock, M. Ballmann, M.P. Boyle, I. Bronsveld, P.W. Campbell, K. De Boeck, S.H. Donaldson, H.L. Dorkin, J.M. Dunitz, P.R. Durie, M. Jain, A. Leonard, K.S. McCoy, R.B. Moss, J.M. Pilewski, D.B. Rosenbluth, R.C. Rubenstein, M.S. Schechter, M. Botfield, C.L. Ordonez, G.T. Spencer-Green, L. Vernillet, S. Wisseh, K. Yen, and M.W. Konstan, *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, 2012. 67(1): p. 12-8.
- 262. Pettit, R.S. and C. Fellner, *CFTR modulators for the treatment of cystic fibrosis*. P&T, 2014. **39**: p. 500-511.
- 263. Kramer, E.L. and J.P. Clancy, *CFTR Modulator Therapies in Pediatric Cystic Fibrosis: Focus on Ivacaftor*. Expert Opin Orphan Drugs, 2016. **4**(10): p. 1033-1042.
- 264. Donaldson, S.H., G.M. Solomon, P.L. Zeitlin, P.A. Flume, A. Casey, K. McCoy, E.T. Zemanick, A. Mandagere, J.M. Troha, S.A. Shoemaker, J.F. Chmiel, and J.L. Taylor-Cousar, *Pharmacokinetics and safety of cavosonstat (N91115) in healthy and cystic fibrosis adults homozygous for F508DEL-CFTR*. J Cyst Fibros, 2017. 16(3): p. 371-379.
- 265. Brewington, J.J., G.L. McPhail, and J.P. Clancy, *Lumacaftor alone and combined with ivacaftor: preclinical and clinical trial experience of F508del CFTR correction*. Expert Rev Respir Med, 2016. **10**(1): p. 5-17.
- 266. Veit, G., R.G. Avramescu, D. Perdomo, P.W. Phuan, M. Bagdany, P.M. Apaja, F. Borot, D. Szollosi, Y.S. Wu, W.E. Finkbeiner, T. Hegedus, A.S. Verkman, and G.L. Lukacs, *Some gating potentiators, including VX-770, diminish DeltaF508-CFTR functional expression.* Sci Transl Med, 2014. 6(246): p. 246ra97.
- 267. Fajac, I. and K. De Boeck, *New horizons for cystic fibrosis treatment*. Pharmacol Ther, 2017. **170**: p. 205-211.
- 268. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
- 269. Del Porto, P., N. Cifani, S. Guarnieri, E.G. Di Domenico, M.A. Mariggio, F. Spadaro, S. Guglietta, M. Anile, F. Venuta, S. Quattrucci, and F. Ascenzioni, *Dysfunctional*

CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against Pseudomonas aeruginosa. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19970.

- 270. Kerbiriou, M., M.A. Le Drevo, C. Ferec, and P. Trouve, *Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(11-12): p. 1236-49.
- 271. Bodvard, K., J. Mohlin, and W. Knecht, *Recombinant expression, purification, and kinetic and inhibitor characterisation of human site-1-protease.* Protein Expr Purif, 2007. **51**(2): p. 308-19.
- 272. Okada, T., K. Haze, S. Nadanaka, H. Yoshida, N.G. Seidah, Y. Hirano, R. Sato, M. Negishi, and K. Mori, *A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 31024-32.
- 273. Wang, N., D. Zhang, X. Mao, F. Zou, H. Jin, and J. Ouyang, *Astragalus polysaccharides* decreased the expression of *PTP1B* through relieving ER stress induced activation of *ATF6* in a rat model of type 2 diabetes. Mol Cell Endocrinol, 2009. **307**(1-2): p. 89-98.
- 274. Han, S.P., Y.H. Tang, and R. Smith, *Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives.* Biochem J, 2010. **430**(3): p. 379-92.
- 275. Dihazi, H., G.H. Dihazi, A. Bibi, M. Eltoweissy, C.A. Mueller, A.R. Asif, D. Rubel, R. Vasko, and G.A. Mueller, *Secretion of ERP57 is important for extracellular matrix accumulation and progression of renal fibrosis, and is an early sign of disease onset.* J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 16): p. 3649-63.
- 276. Dores-Silva, P.R., L.R. Barbosa, C.H. Ramos, and J.C. Borges, *Human mitochondrial Hsp70 (mortalin): shedding light on ATPase activity, interaction with adenosine nucleotides, solution structure and domain organization.* PLoS One, 2015. **10**(1): p. e0117170.
- 277. Singh, O.V., P.J. Mogayzel, C. Jozwik, H.B. Pollard, and P.L. Zeitlin, *Pharmacoproteomics of 4-Phenylbutyrate-Treated IB3-1 Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells.* Journal of Proteome Research, 2006. **5**: p. 562-571.
- 278. Singh, O.V., H.B. Pollard, and P.L. Zeitlin, *Chemical Rescue of F508-CFTR Mimics Genetic Repair in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells*. Mol Cell Proteomics, 2008. 7(6): p. 1099-1110.
- 279. Mayer, M.P., *Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(10): p. 507-14.
- 280. Yang, Y., S. Janich, J.A. Cohn, and J.M. Wilson, *The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**(October): p. 9480-9484.
- 281. Basile, A., M. Pascale, S. Franceschelli, E. Nieddu, M.T. Mazzei, P. Fossa, M.C. Turco, and M. Mazzei, *Matrine modulates HSC70 levels and rescues DeltaF508-CFTR*. J Cell Physiol, 2012. **227**(9): p. 3317-23.
- 282. Freedman, R.B., T.R. Hirst, and M.F. Tuite, *Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding*. TIBS, 1994. **19**(August): p. 331-336.
- Ryu, K.-Y., R. Maehr, C.A. Gilchrist, M.A. Long, D.M. Bouley, B. Mueller, H.L. Ploegh, and R.R. Kopito, *The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance.* The EMBO Journal, 2007. 26: p. 2693-2706.
- 284. Trouve, P., E. Genin, and C. Ferec, *In silico search for modifier genes associated with pancreatic and liver disease in Cystic Fibrosis.* PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173822.

- 285. Ryazanova, L.V., L.J. Rondon, S. Zierler, Z. Hu, J. Galli, T.P. Yamaguchi, A. Mazur, A. Fleig, and A.G. Ryazanov, *TRPM7 is essential for Mg(2+) homeostasis in mammals*. Nat Commun, 2010. 1: p. 109.
- 286. Oancea, E., J.T. Wolfe, and D.E. Clapham, *Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow.* Circ Res, 2006. **98**(2): p. 245-53.
- 287. Li, W.T., S.Y. Zhang, Y.F. Zhou, B.F. Zhang, Z.Q. Liang, Y.H. Liu, Y. Wei, C.K. Li, X.J. Meng, M. Xia, Y. Dan, and J.N. Song, *Carvacrol attenuates traumatic neuronal injury through store-operated Ca(2+) entry-independent regulation of intracellular Ca(2+) homeostasis*. Neurochem Int, 2015. **90**: p. 107-13.
- 288. Zhou, S., A. Takai, and Y. Okada, *Regulation of cardiac CFTR Cl(-) channel activity* by a Mg(2+)-dependent protein phosphatase. Pflugers Arch, 2002. **444**(3): p. 327-34.
- 289. Rao, J., S. Yue, Y. Fu, J. Zhu, X. Wang, R.W. Busuttil, J.W. Kupiec-Weglinski, L. Lu, and Y. Zhai, *ATF6 mediates a pro-inflammatory synergy between ER stress and TLR activation in the pathogenesis of liver ischemia-reperfusion injury*. Am J Transplant, 2014. **14**(7): p. 1552-61.
- 290. Kim, B.J., J.H. Nam, Y.K. Kwon, I. So, and S.J. Kim, *The Role of Waixenicin A as Transient Receptor Potential Melastatin 7 Blocker*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2013. **112**(August): p. 83-89.
- 291. Zierler, S., G. Yao, Z. Zhang, W.C. Kuo, P. Porzgen, R. Penner, F.D. Horgen, and A. Fleig, Waixenicin A inhibits cell proliferation through magnesium-dependent block of transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) channels. J Biol Chem, 2011. 286(45): p. 39328-35.
- 292. Xu, T., B.M. Wu, H.W. Yao, X.M. Meng, C. Huang, M.M. Ni, and J. Li, *Novel insights into TRPM7 function in fibrotic diseases: a potential therapeutic target.* J Cell Physiol, 2015. **230**(6): p. 1163-9.

ANNEXES

Au cours de ma thèse j'ai également eu l'opportunité d'avoir pu apporter une petite contribution à deux autres articles scientifiques :



Cell Calcium 62 (2017) 47-59



Contents lists available at ScienceDirect

Cell Calcium



journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca

Calumenin contributes to ER-Ca²⁺ homeostasis in bronchial epithelial cells expressing WT and F508del mutated CFTR and to F508del-CFTR retention



Réginald Philippe^{a,1}, Fabrice Antigny^{b,c,d,1}, Paul Buscaglia^a, Caroline Norez^c, Florentin Huguet^a, Cyril Castelbou^d, Pascal Trouvé^a, Frédéric Becq^c, Maud Frieden^d, Claude Férec^a, Olivier Mignen^{a,*}

Florentin HUGUET

73, rue Jean Jaurès 29200 Brest Tél : 06.31.14.29.92 Mail : <u>florentin.huguet@gmail.com</u> Researchgate.net/profile/Florentin_Huguet Né le 22/12/1988 à Saint-Nazaire (44)

PARCOURS UNIVERSITAIRE

| 2013/2017 | <u>Doctorat</u> de Biologie, spécialité génétique humaine, génétique épidémiologique et fonctionnelle, biotechnologies. Inserm UMR-1078, CHRU Morvan et Université de Bretagne Occidentale, Brest (29) |
|--------------|---|
| 2012/2013 | <u>Master 2</u> Génétique, Génomique et Biotechnologies, mention AB UFR Médecine, Université de Bretagne Occidentale, Brest (29) |
| Janvier 2012 | Formation diplômante d'Expérimentation Animale Niveau 1 ONIRIS - Ecole vétérinaire de Nantes (44) |
| 2011/2012 | <u>Master 2</u> Physiologie des Régulations, mention AB <i>UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale, Brest (</i> 29) |
| 2010/2011 | <u>Master 1</u> Biologie et Santé, spécialité Physiologie Animale et Humaine, mention AB UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne Occidentale, Brest (29) |
| 2007/2010 | Licence de Biologie Générale, spécialité Physiologie Animale et Humaine, mention AB UFR Sciences et Techniques, Université de Bretagne-Sud, Vannes (56) |

SITUATION ACTUELLE

Actuellement en dernière année de doctorat à l'UBO. « Implication de la voie ATF6 dans la mucoviscidose ». La soutenance de thèse se déroulera en Juin 2017.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Octobre 2013-Juin 2017 : Doctorat de Biologie Moléculaire et Biomédicale (3 ans et 6 mois) Inserm UMR-1078, Brest (29) Objectifs : Etude de l'implication de la voie ATF6 dans la mucoviscidose, et étudier l'effet d'une molécule correctrice sur le transport à la membrane du CFTR-F508del. Directeur de thèse : Pascal Trouvé Co-directeur de thèse : Mathieu Kerbiriou Directeur du laboratoire : Pr. Claude Férec

Janvier-Juin 2013 : Stage de Master 2 (6 mois) Inserm UMR-1078, Brest (29) Objectifs : Etude des interactions entre ATF6, NUCB1 et S1P sur un modèle de pathologie : la mucoviscidose. Encadrant : Mathieu Kerbiriou Directeur du laboratoire : Pr. Claude Férec Janvier-Juin 2012 : Stage de Master 2 (6 mois) Laboratoire IFREMER (PFOM-ARN), Brest (29) <u>Objectifs</u> : Mise au point d'une technique de dosages de nouveaux marqueurs du métabolisme énergétique chez la sole commune (*Solea solea*). <u>Encadrant</u> : David Mazurais <u>Directeur du laboratoire</u> : José Zambonino

Janvier-Février 2011 : Stage de Master 1 (2 mois) Laboratoire ORPHY, Brest (29) Objectifs : Etude de l'impact d'un stress chimique et de ses interactions avec un stress thermique sur le flet (Platichthys flesus) Encadrant : Michaël Théron Directeur du laboratoire : Philippe Sébert

ARTICLES SCIENTIFIQUES

6/7 – Un article en position intermédiaire portant sur la signalisation calcique dans la pancréatite chronique sont en cours de realisation.

4/5 – Deux articles scientifiques portant sur l'implication de l'UPR et de la voie ATF6 dans la mucoviscidose (F508del) sont actuellement en cours de soumission.

3 – Réginald Philippe, Fabrice Antigny, Paul Buscaglia, Caroline Norez, **Florentin Huguet**, Cyril Castelbou, Pascal Trouvé, Frédéric Becq, Maud Frieden, Claude Férec, Olivier Mignen. *Calumenin contributes to ER-Ca2+ homeostasis in bronchial epithelial cells expressing WT and F508del mutated CFTR and to F508del-CFTR retention*. Cell Calcium, February 2017. DOI : 10.1016/j.ceca.2017.01.011

2 – **Huguet F**, Calvez ML, Benz N, Le Hir S, Mignen O, Buscaglia P, Horgen FD, Férec C, Kerbiriou M and Trouvé P. *Function and regulation of TRPM7, as well as intracellular magnesium content, are altered in cells expressing DF508-CFTR and G551D-CFTR.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2016.

1 – Pascal Trouvé, Marie-Laure Calvez, Stéphanie Moisan, Sophie Le Hir, **Florentin HUGUET**, Nathalie Benz, Mathieu Kerbiriou and Claude Férec. *Rapid detection of the mature form of cystic fibrosis transmembrane regulator by surface plasmon resonance*. Anal. Methods, 2015, 7, 226.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- HUGUET F., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. *Implication de la voie ATF6 de l'UPR dans la mucoviscidose*. Colloque annuel IBSAM (Brest, France, 11 Juin 2015). Présentation orale

- **HUGUET F**., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. *Etude de l'implication de l'UPR dans la mucoviscidose (2 ème partie).* 16 ème Colloque des Jeunes Chercheurs (Paris, France, 16 et 17 Février 2015). Poster

- HUGUET F., Calvez M-L., Benz N., Le Hir S., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. *Implication de l'UPR dans la mucoviscidose*. Journée de l'Inserm 2015 (Logonna-Daoulas, France, 8 Septembre 2014). Poster

- **HUGUET F**., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. Etude de l'implication de l'UPR dans la mucoviscidose (1 ère partie). 15 ème Colloque des Jeunes Chercheurs (Paris, France, 17 et 18 Février 2014). Poster - HUGUET F., Kerbiriou M., Trouvé P., Férec C. *Etude de l'interaction de S1P, NUCB1 et ATF6 : implications pour la mucoviscidose.* 16 ème Journée de Jeunes Chercheurs de la SFR ScinBios (Brest, France, 29 Novembre 2013). Poster

COMPETENCES EN BIOLOGIE :

Biologie cellulaire :

- Culture bactérienne, transformations bactériennes
- Culture de lignées cellulaires humaines
- Transfections de plasmides et ARNi sur cellules eucaryotes
- Test de viabilité cellulaire
- Mesure oxymétrique sur tissus isolés

Biologie moléculaire :

- Extraction et purification d'ADN et ARN
- Q-PCR
- Electrophorèse (BET, GelRed...)
- Séquençage ADN
- Lyse cellulaire et dosage protéique
- Western blot, co-immunoprécipitation, ELISA, Biotinylation
- Purification de protéine (FPLC AKTA[®])
- Etude d'interactions protéiques : Résonnance plasmonique de surface (Biacore[®])

BREVETS : Brevet (dépôt en cours) portant sur deux molécules potentiellement thérapeutiques et applicables à la mucoviscidose F508del.



INFORMATIQUE :

- Maîtrise des différents systèmes d'exploitation (Windows, Mac, Linux)
- Maîtrise des suites Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint...) et équivalents libres
- Utilisation de logiciels de traitements d'images (ImageJ, Bio1D, Infinity...)

COMPETENCES PERSONNELLES :

- Facilité d'adaptation
- Facilité d'écriture et de synthèse
- Bonne capacité de mémorisation
- Facilité à travailler en équipe
- Curiosité scientifique
- Sociable

LOISIRS :

- Plongée sous-marine en bouteille Niveau 2 PADI
- Course à pied, Badminton
- Cinéma
- Physique, chimie





Objectifs

Etudier l'UPR, et plus précisément la voie ATF6, afin de préciser le mécanisme d'inhibition du CFTR par ATF6, ainsi que le rôle inhibiteur de NUCB1 sur ATF6 :

Etude de l'expression des différentes protéines d'intérêt
 Etude des interactions entre ATF6, S1P et NUCB1



Conclusions - Perspectives

- Les résultats montrent que plusieurs protéines de l'UPR telles que BiP et ATF6 sont surexprimées dans les cellules HeLa-F508del et CFBE F508del par rapport aux cellules WT, prouvant que l'UPR est déclenchée dans les cellules exprimant CFTR-F508del, confirmant les résultats obtenus auparavant dans A549-F508del.
 D'autre part, la surexpression de NUCB1 dans les cellules exprimant un CFTR-F508del est en accord avec la littérature et notamment le rôle de régulateur négatif de l'UPR par NUCB1.
- par NUCB1.
 Des expériences d'inhibition et de surexpression de ces différentes protéines sont en cours de réalisation et permettront de mieux comprendre ce complexe protéique incluant ATF6, S1P et NUCB1, dans un contexte de mucoviscidose (F508del).
- Grâce à des techniques telles que la 2D et la spectroscopie de masse, l'objectif est d'identifier de nouveaux partenaire protéiques impliqués dans la voie ATF6, mais également de mieux comprendre les différentes interactions protéiques existantes au sein de ce complexe.
- Une meilleure compréhension des interactions protéiques mises en jeu dans la régulation du CFTR par ATF6 ouvrira, à terme, de nouvelles voies d'investigation sur la possibilité de lever la répression transcriptionnelle d'ATF6 sur le CFTR et fournira peut-être un moyen efficace d'améliorer l'état de santé de patients atteints d'une maladie dite « conformationnelle » telle que la mucoviscidose.

Impact de la modulation de TRPM7 et ATF6 sur le cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

La mucoviscidose est une maladie causée par des mutations du gène *cftr* entraînant des défauts importants de la protéine CFTR. La mutation la plus fréquente (F508del) est caractérisée par un repliement incorrect conduisant à la rétention de la protéine dans le RE. L'accumulation de CFTR-F508del dans le RE, l'inflammation et les infections vont déclencher un stress du RE dans les cellules épithéliales ainsi que l'UPR. Cette dernière est une réponse adaptative déclenchée par le stress du RE et permet de rétablir l'homéostasie de ce compartiment. L'UPR est constituée de trois voies majeures dont l'une d'entre elles est activée dans les cellules exprimant un CFTR-F508del. Il s'agit de la voie ATF6 qui est de plus responsable de la répression transcriptionnelle du CFTR, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle. Nous avons montré que son inhibition conduit à l'amélioration de la fonction du CFTR-F508del et à l'augmentation de sa présence à la membrane des cellules.

Nous nous sommes également intéressés au Mg²⁺ et au TRPM7, le régulateur principal de la $[Mg^{2+}]_i$ dans les cellules. Nous avons émis l'hypothèse que TRPM7 était en partie responsable de l'activation d'ATF6 dans les cellules exprimant un CFTR-F508del. Le but de cette seconde partie du projet était donc tout d'abord d'étudier la relation existante entre le Mg²⁺, TRPM7 et le CFTR. Nous avons montré qu'il existait des différences de $[Mg^{2+}]_i$ selon le type de mutation du CFTR exprimé par les cellules. Ces différences sont en partie dues à un défaut d'activation de TRPM7, lui-même probablement lié à un défaut du CFTR. En augmentant l'activité de TRPM7 par du Naltriben, nous avons pu montrer un effet potentialisant sur le CFTR-G551D.

Mots-clés : Mucoviscidose, CFTR, F508del, UPR, TRPM7, Mg²⁺

Impact of TRPM7 and ATF6 modulation on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Cystic fibrosis is caused by mutations in the *cftr* gene resulting in several defaults on the CFTR protein. The most frequent mutation is F508del which is characterized by an incorrect folding causing its retention within the ER. CFTR-F508del protein accumulation in the ER, inflammation and infections will trigger the ER stress in epithelial cells, as well as UPR. UPR constitutes an adaptive response of the ER in order to restore ER's homeostasis. UPR consists in three major pathways. Among them, one is activated in cells expressing CFTR-F508del protein. The ATF6 pathway of UPR is responsible of the transcriptional repression of CFTR, which makes of it a potential therapeutic target. We showed that the inhibition of ATF6 leads to the improvement of CFTR-508del function, as well as its increased presence in the cellular membrane. We were also interested in Mg²⁺ and TRPM7, the main regulator of [Mg²⁺]_i. We suspected that TRPM7 is, at least in part, responsible for the activation of ATF6 in cells expressing the mutant CFTR-F508del. Thus, the second part of my work was focused on the study of the relationship between Mg^{2+} , TRPM7 and CFTR. We showed the existence of $[Mg^{2+}]_i$ differences according to CFTR mutant expressed in cells. These differences are the result of an altered TRPM7 activation, probably in link with the mutated CFTR's malfunction. We proved that increasing TRPM7 activity by Naltriben treatment potentiates CFTR-G551D.

Keywords : *Cystic fibrosis, CFTR, F508del, TRPM7, Mg*²⁺